Die Wirkung von Silber auf das Selenoenzym Glutathionperoxidase (E.C. 1.11.1.9.)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Günther Sawatzki
aus Kassel

1977

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0055

Die Wirkung von Silber auf das Selenoenzym Glutathionperoxidase (E.C. 1.11.1.9.)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Günther Sawatzki
aus Kassel

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		14. Dezember 1977
Dekan	:	Prof. W. Zeil
1. Berichterstatter	:	Dozent Dr. A. Wendel
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. U. Weser

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dozent Dr. A. Wendel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. (Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. A. Wendel für die Überlassung des Themas und insbesondere für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Untersuchungen danken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe IV sowie allen anderen Angehörigen des Physiologisch-chemischen Institutes, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen, gilt mein ausdrücklicher Dank.

Besonderen Dank schulde ich:
Herrn Diplom-Biochemiker B. Kerner, Frl. cand. biochem. Monika Mader und Frl. cand. biochem. Sylvia Feuerstein für die Ausführung der Selen-Analysen;

Herrn cand. biochem. Walter Oberrauch für seine Unterstützung bei der Durchführung der SDS-Elektrophoresen;

Herrn Prof. Weser und seiner Arbeitsgruppe für die wertvolle Unterstützung bei der Diskussion und für viele Tips bei den Experimenten;

Herrn Prof. G. Tölg, Schwäbisch-Gmünd, für die Beratung bei der Durchführung der Selenanalysen;

Herrn Prof. A. Fredga (Schweden) für die Überlassung seiner in deutscher Sprache abgefaßten Originalarbeiten;

und dem Isotopenlabor unter Leitung von Prof. Probst für die Hilfe und das Verständnis bei der Durchführung der Arbeiten mit dem radioaktiven Silber.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel als Institutsdirektor danke ich für sein Verständnis, das zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Das Enzym Glutathionperoxidase	1
1.1.1.	Molekulare Daten der Glutathion-peroxidase	2
1.1.2.	Untersuchungen zum Reaktions-mechanismus	3
1.1.2.1.	Die Reaktion der Glutathionperoxidase ..	3
1.1.2.2.	Aktivierung und Inhibition des Enzyms ..	4
1.1.2.2.1.	Aktivierung	4
1.1.2.2.2.	Inhibitoren der Glutathionperoxidase ...	4
1.1.3.	Glutathionperoxidase als Selenoenzym ...	5
1.2.	Das Spurenelement Selen	5
1.2.1.	Stoffwechsel von Selen in Tieren	6
1.2.2.	Alternativen der biologischen Rolle von Selen	6
1.2.2.1.	Die Membranschutzfunktion von Selen in der Glutathionperoxidase	8
1.2.2.2.	Selen in der Homöostase-Wechsel-wirkung mit Metallen	8
1.2.2.2.1.	Selen und Quecksilber	9
1.2.2.2.2.	Selen und Cadmium	14
1.2.2.2.3.	Selen und Arsen	15
1.2.2.2.4.	Selen und Kupfer	16
1.2.2.2.5.	Selen und Zink	17
1.2.2.2.6.	Selen und Blei	18
1.2.2.2.7.	Selen und Silber	18

Seite

1.3. Der Selenantagonist Silber 21

1.3.1. Das Element Silber 21

1.3.2. Pharmakologie des Silbers 22

1.3.3. Silber-Vorkommen in der Biosphäre 22

1.3.4. Silber-Verhalten im tierischen Organismus 23

1.3.5. Zur Biochemie des Silbers 24

1.3.6. Reaktionen von Silber mit Selenverbindungen 26

1.4. Selenantagonismus und Krebs 28

1.5. Ziele der Arbeit 29

2. Geräte und Materialien 31

2.1. Geräte 31

2.2. Chemikalien und Hilfsmittel 32

3. Methoden 33

3.1. Isolierung und Lagerung der GSH-Peroxidase 33

3.2. Proteinbestimmungen 33

3.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSH-Peroxidase 33

3.4. Selenbestimmungen 33

3.5. Diskontinuierliche Gelelektrophoresen 34

3.6. Kontinuierliche Gel-Elektrophoresen in Gegenwart von SDS 34

3.7. Silbernachweismethoden 35

3.7.1. γ-Spektrometrie des ^{110m}Ag 35

3.7.2. Ag^+-Bestimmungen mit der Ag^+/S^{2-} ionensensitiven Elektrode 35

Seite

3.8. Inhibitionsversuch mit der GSH-Peroxidase 36

3.8.1. Versuche zur Inaktivierung mit γ-Glutamyltranspeptidase 36

3.8.1.1. Anreicherung der γ-Glutamyltranspeptidase 37

3.8.1.2. Inaktivierungsansatz mit γ-Glutamyltranspeptidase 37

3.8.2. Inaktivierungsversuche mit Schwermetallen 38

3.8.3. Inaktivierungsversuche mit Halogenen und Halogeniden 38

3.8.4. Weitere Inaktivierungsversuche 39

3.9. Die Inhibition von GSH-Peroxidase durch Silber 40

3.9.1. Die Silberhemmung in Abhängigkeit von der Enzymform 40

3.9.2. Versuche zur Hemmung mit Ag^+ und Ag^o ... 40

3.9.3. Zeitabhängigkeit der Silberhemmung 41

3.9.4. Konzentrationsabhängigkeit der Silberhemmung 41

3.9.5. Inhibitionsstudien mit $(AgCN)CN^-$ 42

3.9.6. Hemmversuche mit silberbeladenem Kieselgel 42

3.9.7. Silberhemmung der GSH-Peroxidase im Erythrocyten 42

3.10. Reaktivierungsversuche der Silber-gehemmten GSH-Peroxidase 43

3.10.1. Reaktivierungsversuche mit GSH 43

3.10.2. Reaktivierungsversuche mit UV-Licht 43

3.10.3. Reaktivierungsansätze mit kolloidalem Selen 44

Seite

3.11. Untersuchungen mit dem radioaktiven Isotop ^{110m}Ag 44

3.11.1. ^{110m}Ag-Behandlung von reduzierter GSH-Peroxidase 45

3.11.2. ^{110m}Ag und Jodacetamid behandelte GSH-Peroxidase 45

3.12. Auswirkungen der Silberionen auf den Selengehalt der GSH-Peroxidase 45

3.12.1. Sephadex G-25-Chromatographie des silbergehemmten Enzyms 46

3.12.2. Sephadex G-150-Chromatographie des silbergehemmten Enzyms 48

3.13. Silberwirkung auf Selenoaminosäuren ... 49

3.14. Titration der GSH-Peroxidase an der Ag^+-ionensensitiven Elektrode 50

3.14.1. Darstellung des Guanidinacetat 50

3.14.2. Vergleichende Titration von GSH mit und ohne 3,85 M GuAc 50

3.14.3. Vergleichende Titration von Mercaptoäthanol 51

3.14.4. Titrationsexperimente mit der GSH-Peroxidase in 3,85 M GuAc 51

3.14.4.1. Versuch der Titration in 3,85 M GuAc .. 52

3.14.4.2. Titration bei erhöhter Proteinkonzentration 52

3.14.4.3. Vollständige Titration mit Selenanalytik, Aktivitätskontrolle und Gelelektrophoresen der Glutathionperoxidase 53

3.14.4.4. Vollständige Titration für weitere Stöchiometrie-Berechnung 54

Seite

4.	Ergebnisse	55
4.1.	Silbernachweismethoden	55
4.1.1.	γ-Spektrometrie des ^{110m}Ag-Isotops ...	55
4.1.2.	Ag^+-Bestimmung mit der ionensensitiven Elektrode	59
4.2.	Allgemeine Inhibitionsexperimente mit der Glutathionperoxidase	64
4.2.1.	Inaktivierungsversuche mit der γ-Glutamyltranspeptidase	66
4.2.2.	Schwermetallinaktivierungsversuch	66
4.2.3.	Inaktivierungsversuche mit Halogenen und Halogeniden	68
4.2.4.	Weitere Inhibitionsstudien	68
4.3.	Inhibition von GSH-Peroxidase durch Silber	68
4.3.1.	Silberhemmung und Enzymform	69
4.3.2.	Hemmung durch Ag^+ und/oder Ag^o	69
4.3.3.	Zeitabhängigkeit der Ag^+-Hemmung	70
4.3.4.	Ag^+-Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung	70
4.3.5.	Inhibition mit $(AgCN)CN^-$	72
4.3.6.	Hemmungen mit silberbeladenem Kieselgel	72
4.3.7.	Ag^+-Hemmung der GSH-Peroxidase im Erythrocyten	73
4.4.	Reaktivierungsversuche der Ag^+-gehemmten GSH-Peroxidase	73
4.4.1.	Reaktivierungsversuche mit GSH	74
4.4.2.	Reaktivierungsversuche mit UV-Licht ...	74
4.4.3.	Reaktivierung mit colloidalem Selen ...	74

Seite

4.5. Untersuchungen mit ^{110m}Ag 75

4.5.1. ^{110m}Ag-Behandlung von reduzierter GSH-Peroxidase 76

4.5.2. Jodacetamid- und nachfolgende ^{110m}Ag-Behandlung 76

4.6. Ag^+-Wirkung und Selengehalt des Enzyms . 79

4.6.1. Sephadex G-25-Chromatographie nach Ag^+-Behandlung 79

4.6.2. Sephadex G-150-Chromatographie des Ag^+-behandelten Enzyms 83

4.7. Silberwirkung auf Selenoaminosäuren 85

4.8. Titrationen der GSH-Peroxidase - Ag^+-ionensensitive Elektrode 85

4.8.1. Titration von GSH mit und ohne 3,85 M GuAc 86

4.8.2. Titration von Mercaptoäthanol mit und ohne 3,85 M GuAc 90

4.8.3. Titration der GSH-Peroxidase 95

4.8.3.1. Titration in 3,85 M GuAc 95

4.8.3.2. Titration bei erhöhter Proteinkonzentration 97

4.8.3.3. Titration mit stöchiometrischer Auswertung, Aktivitätskontrolle, Selenanalytik sowie Gelelektrophoresen des Proteins 99

4.8.3.4. Weitere Titration mit stöchiometrischer Auswertung 104

5. Diskussion 108

5.1. Zu den Inhibitionsstudien mit der Glutathionperoxidase 108

5.2. Silber als Inhibitor der Glutathionperoxidase 109

Seite

5.3. Die Selenkomponente der GSH-Peroxidase und Silber 112

5.4. Modell der Ag^+-Wirkung auf die GSH-Peroxidase 113

5.5. Vorstellungen zur Selenkomponente der GSH-Peroxidase 116

5.5.1. Modell der alternierenden Sulfoselenid-Gruppierung 116

5.5.2. Das Selenoamid-Modell und die "solvated structure" Stabilisierung 118

6. Zusammenfassung 120

Literaturverzeichnis 122

ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserum-Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerytrit
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	oxidiertes Glutathion
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
GuAc	Guanidinacetat
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
MOPS	N-Morpholino-3-propansulfonsäure, sowie als Bezeichnung für den Puffer (als K^+-Salz)
POD	Peroxidase (meist mit Präfix GSH: Glutathion-peroxidase)
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat
NADP	dto., oxidiert
SDS	Sodiumdodecylsulfate = Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
U	Unit(s): enzymatische Aktivitätseinheit
cmp	counts per minute = Impulse pro Minute
A_{280}	Absorption bei 280 nm

1. Einleitung

Seit 1973 ist Selen als integraler Bestandteil des Enzyms Glutathionperoxidase bekannt [1,2,3]. Damit wurden zwei jahrelang unabhängig voneinander existierende Forschungsrichtungen - die Biochemie des Selens und die Arbeiten über das Enzym Glutathionperoxidase - auf eine gemeinsame Basis gestellt, von der aus es nun möglich war, einerseits die biologische Bedeutung des Spurenelements Selen zu erklären und andererseits die Reaktionseigenschaften des Enzyms Glutathionperoxidase unter dem Gesichtspunkt der Beteiligung des Selens zu betrachten.
Der getrennt verlaufende Weg dieser beiden Forschungsrichtungen hatte jedoch zeitlich einen gemeinsamen Anfang. Im Jahr 1957 entdeckte SCHWARZ und FOLTZ [4] die biologische Bedeutung des Selens und im gleichen Jahr leitete MILLS [5] die Untersuchungen über das Enzym Glutathionperoxidase ein. So stellte zwar das Jahr 1973 durch die Vereinigung beider Wege einen vorläufigen Abschluß dar, aber zugleich warf die neue Erkenntnis nun die Frage nach der Rolle des Selens in dem Enzym auf.
Vom Reaktionsmechanismus des Enzyms, über seine Substratspezifität, seine Aktivierungs- und Inhibitionsmöglichkeiten bis zu seinen molekularen Eigenschaften mußte sich eine Beteiligung des Selens am Reaktionsgeschehen erklären lassen.

Die neue Erkenntnis, daß Silber dieses Enzym hemmt, soll nun den bereits bekannten Eigenschaften des Enzyms zugeordnet werden und dabei sowohl die Wechselwirkung von Selen und Silber sowie analog reagierenden Schwermetallen, als auch die biochemischen Wirkungen von Silber erörtert werden.

1.1. Das Enzym Glutathionperoxidase

Der Glutathionperoxidase kommt eine bedeutende Rolle im Peroxidstoffwechsel der Zellen zu [8] und so ist sie im Organismus - sicherlich nicht zufällig - besonders an solchen Or-

ten gehäuft anzutreffen, an denen entweder ein hoher Sauerstoffdurchsatz wie in Erythrozyten herrscht, oder in stark durchbluteten Organen wie der Leber, der Niere, der Milz, dem Herzen und der Lunge [6].

Neben der Katalase und der Superoxid-Dismutase [7] ist die Glutathionperoxidase am Schutz des Organismus vor zerstörenden Wirkungen des Sauerstoffs beteiligt. Diese gefährlichen Wirkungen des Sauerstoffs zeigen sich in einer Vielfalt von Stoffen, unter anderem bei den vom Sauerstoff abzuleitenden freien Radikalen ($\cdot OH$, $\cdot O\text{-}O\cdot$, $O_2\cdot^-$), dem H_2O_2 und den Hydroperoxiden, besonders den Lipidhydroperoxiden. Glutathionperoxidase kann jedoch als einziges System neben dem H_2O_2 auch eine Vielfalt von Hydroperoxiden umsetzen [9].

Als Donorsubstrat benötigt die Glutathionperoxidase sehr spezifisch Glutathion (GSH); sie katalysiert folgende Reaktion:

$$ROOH + 2\ GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Die bei der Reaktion entstehenden Hydroxysäure-Derivate sind stabil und nehmen nicht an der Bildung freier Radikale teil. Damit ist es der Glutathionperoxidase möglich, die autokatalytische Kettenreaktion der Lipidperoxidation zu unterbrechen und Zellmembranen vor oxidativer Schädigung zu schützen [14,36].

1.1.1. Molekulare Daten der Glutathionperoxidase

Das Enzym wurde bis heute aus Rindererythrocyten [10,1], Schafserythrocyten [2] und Rattenleber [3] isoliert. Für alle Enzymtypen kann folgendes gemeinsam festgestellt werden:

a) das Molekulargewicht bewegt sich zwischen 80.000 und 90.000
b) das Enzym enthält 4 Selenatome pro Molekül
c) das Enzym besteht aus 4 proteinchemisch identischen Untereinheiten.

Die am besten untersuchte Spezies ist das Enzym aus Rindererythrocyten, weil es zur Zeit das einzige ist, das in wägbaren Mengen[10] und sogar in kristallisierter Form[1] vorliegt. Letzteres ermöglichte erste Untersuchungen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse[11,12], die darauf hindeuten, daß in dem Molekül die Untereinheiten zu je 2 Dimeren zusammengelagert sind.
Zu den spektralen Eigenschaften[13] läßt sich folgendes feststellen: Das Enzym enthält keine Häm- oder Flavin-Gruppierung, wie etwa andere Peroxidasen, und das CD Spektrum zeigt keinen Cotton-Effekt im sichtbaren Bereich.

1.1.2. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

1.1.2.1. Die Reaktion der Glutathionperoxidase

Bezüglich des Donorsubstrates, GSH, ist das Enzym sehr spezifisch, bezüglich seiner Akzeptorsubstrate zeichnet es sich geradezu durch seine Unspezifität aus[9]. Für den Reaktionsmechanismus wurde ein Ping-pong-Mechanismus gefordert[15]. Das Selenatom führt unter Einfluß der Substrate einen Redoxwechsel durch[16]. Das folgende Schema soll diese Daten zusammenfassen:

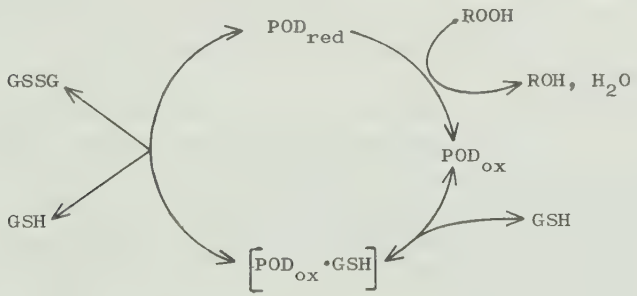


Abb. 1: POD = Glutationsperoxidase; POD_{red} = reduzierte Enzymspezies; POD_{ox} = oxidierte Enzymspezies; GSH = Donorsubstrat (spezifisch); ROOH = Hydroperoxide (vielfältiger Art); ROH = Hydroxysäure-Derivate

1.1.2.2. Aktivierung und Inhibition des Enzyms

1.1.2.2.1. Aktivierung

GÜNZLER[17] konnte nachweisen, daß unbehandelte Enzymchargen durch Glutathion zeitabhängig aktiviert werden können, wobei nach etwa 10 min. Vorinkubation mit GSH die maximale Aktivität der Glutathionperoxidase erreicht wird und dieser Effekt sicherlich eine Funktion der SH-Gruppe des GSH ist. Interessant ist dieser Vorgang jedoch besonders im Zusammenhang mit der Effektivität von Inhibitoren.

1.1.2.2.2. Inhibitoren der Glutathionperoxidase

Die Inhibitoren lassen sich in drei Gruppen unterteilen; und zwar in solche, die mit beiden Enzymformen reagieren, solche, die nur auf die reduzierte Enzymform inhibierend wirken und solche, die nur mit der oxidierten Enzymform Effekte zeigen.
Zu den von der Enzymform unabhängig wirkenden Inhibitoren gehören p-Chlormercuribenzoat, 4,4'-Dithiopyridin, Tetranitromethan, 5,5'-Dithiobis(-2 nitrobenzoat), Bengalrosa (Photooxidation) und der Komplex aus EDTA und Hg^{2+}-Ionen. Allen diesen Inhibitoren ist gemeinsam, daß sie keine totale Hemmung zur Folge haben[17]. Spezifischer Inhibitor für die durch GSH reduzierte Enzymform ist Jodacetat, wobei eine totale Inaktivierung des Enzyms eintritt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang das strukturverwandte Jodacetamid, das keine Inhibitoreigenschaften hat[17].
Ein Inhibitor, der nur auf die oxidierte Enzymform wirkt, ist das Cyanid-Ion[18]. Bei dieser Reaktion wird das Selen aus dem Enzym freigesetzt, jedoch ist nicht geklärt, in welcher Form.

1.1.3. Glutathionperoxidase als Selenoenzym

Der erste Nachweis der Glutathionperoxidase als Selenhaltiges Enzym gelang FLOHÉ et al.[1] mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse. Ein weiterer Hinweis kam von ROTRUCK und Mitarbeitern[19]. Diese beobachteten einen Schutzeffekt bei der Hämolyseneigung von Erythrocyten sowohl von Selen als auch von Glucose und kamen bei der Suche nach einem gemeinsamen Wirkungsort von der Glucose über den NADPH-abhängigen GSH-Stoffwechsel einerseits und vom selenabhängigen Schutz des Hämoglobins vor Oxidation andererseits zum Enzym Glutathionperoxidase.
Im Laufe der letzten Jahre galt nun der Frage nach der Form, in der das Selen im Glutathionperoxidasemolekül vorliegt, großes Interesse. Erste Versuche, die bekannten Selenoaminosäuren im Hydrolysat des Enzyms nachzuweisen[17,20], waren entweder nicht eindeutig oder konnten mit den verwendeten Methoden keine solchen nachweisen.
Mögliche Erklärungen dafür sind:

a) relative Instabilität von organischen Selenverbindungen, besonders gegenüber oxidativen Bedingungen,
b) eine durch das intakte Proteinmolekül stabilisierte Form der Selenkomponente, die möglicherweise nicht eine der bisher bekannten Selenoaminosäuren darstellt.

1.2 Das Spurenelement Selen

Obwohl das Element 1842 von JAPHA[21] als toxisch eingestuft wurde, kann man es heute als essentielles Spurenelement[22] ansehen. Für Pflanzen ist keine Selenabhängigkeit gefunden worden[24]. Mikroorganismen sind jedoch im Wachstum von Selen abhängig, wie E. coli[25], oder haben sogar Selenoproteine, wie die Formiat-Dehydrogenase[26] und die Glycin-Reductase[27]. Bei Pflanzen konnte nachgewiesen werden, daß sie aus anorganischem Selen Selenoaminosäuren synthetisieren können[28], für den tierischen Organismus gibt es für diesen

Syntheseweg keine eindeutigen Nachweise[29].

1.2.1. Stoffwechsel von Selen in Tieren

Der am besten untersuchte Stoffwechselweg des Selens ist der von PAINTER[31] beschriebene und von GANTHER[32] neu formulierte Selenotrisulfidweg:

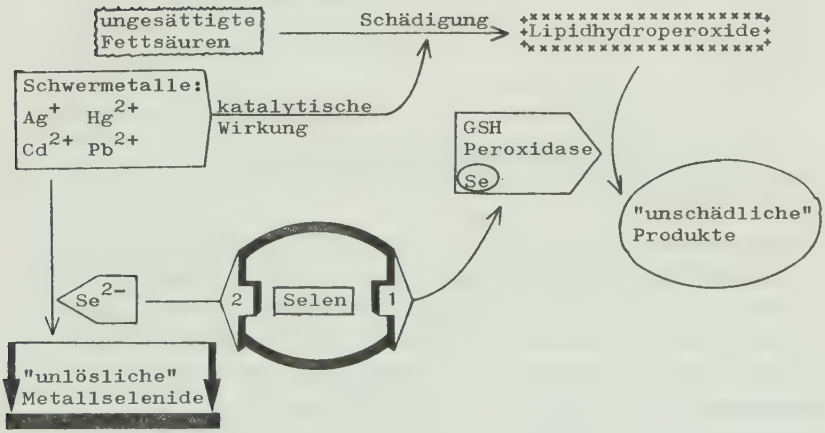
$$4\ RSH + H_2SeO_3 \longrightarrow \underset{\text{(Selenotrisulfid)}}{RS\text{-}Se\text{-}SR} + RSSR + 3\ H_2O$$

Neuere Untersuchungen von HSIEH und GANTHER[33] konnten bestätigen, daß Glutathion das einzige Thiol ist, das diesen Reaktionsweg bis zur Bildung des Dimethylselenids ermöglicht, wobei das Enzym Glutathionreduktase beteiligt ist. Für den Stoffwechsel des Selens bei der Bindung an Plasmaproteine kommt dem Erythrocyten eine besondere Rolle zu[30,39]; nach der Passage durch den Erythrocyten nimmt die Bindungsstabilität des Selens an die Plasmaproteine deutlich zu[35]. Die Ausscheidung des Selens erfolgt durch die Lungen (Dimethylselenid)[37], die Nieren (Trimethylselenonium Ion)[38] sowie in geringerem Maß in den Faeces (Se^{o})[40]. Die Methylierungsschritte werden in der Leber unter S-Adenosylmethionin-Umsatz ausgeführt[41]. Das Enzym Methionin-Adenosyl-Transferase, das daran beteiligt ist, wird fatalerweise durch Selenit gehemmt[42]. Dadurch wird ein für die Ausscheidung notwendiger Schritt blockiert, und somit kann diese Wirkung eine Erklärung für die Hepatotoxizität von zu hohen Selenitdosen sein.

1.2.2. Alternativen der biologischen Rolle von Selen

Die Erscheinungen bei Selenmangel, die letzten Endes immer beim Gewebszerfall enden, kann man unter zwei alternativen Aspekten der Selenrolle beim Zellschutz zu erklären versuchen.

Die erste Erklärung leitet sich von der alten "Antioxidanz-Theorie"[43] ab und besagt im Prinzip, daß Selen ebenso wie Vitamin E bei der oxidativen Schädigung von ungesättigten Lipiden einen Schutzfaktor darstellt.
Die zweite Möglichkeit ist die einer Homöostase-Funktion in Bezug auf die Entgiftungsfunktion gegenüber Schwermetallen; wobei letztere ebenso Schäden an Lipiden verursachen können. Beide Möglichkeiten soll nachstehendes Schema verdeutlichen:



Alternativen der Selenwirkung
==========

1.2.2.1. Die Membranschutzfunktion von Selen in der Glutathionperoxidase

Neben der Reaktion der Glutathionperoxidase mit dem Substrat H_2O_2, für die die Katalase eine Konkurrenz darstellt, dürfte die Reaktion mit den verschiedensten organischen Hydroperoxiden die bedeutendere des Enzyms sein. Besonders wichtige Substrate sind die Lipidhydroperoxide der Zellmembran, die letztendlich mitverantwortlich für den Zustand der Zellmembran sind[8,36]. Damit erfüllt die Glutathionperoxidase die Funktion, die als Konsequenz aus vielen Versuchen und der "Antioxidanz-Theorie" abzuleiten ist. Hierbei kann das Selen auch in Mengen, die zu gering wären, um einen direkten Umsatz(wie es von der "Antioxidanz-Theorie" gefordert wird) mit den Substraten zu ermöglichen, katalytisch die geforderte Funktion erfüllen. Damit ergibt sich zugleich eine Absage an die klassische "Antioxidanz-Theorie"[22].

1.2.2.2. Selen in der Homöostase-Wechselwirkung mit Metallen

Schwermetalle als potentielle Radikalbildner können wesentlich an der Bildung von Lipidhydroperoxiden und damit an der Zerstörung der Zellintegrität beteiligt sein[8]. Daneben ist bekannt, daß viele Enzyme durch dieselben sowohl reversibel als auch irreversibel gehemmt werden können[44]. Die Beseitigung dieser Umweltgifte durch Selen in seiner (unbekannten) metabolisch aktiven Form ist im wesentlichen für folgende Stoffe beschrieben: Ag^+, Hg^{2+}, $MeHg^+$, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+} und AsO_2^- [23].
Die starke chemische Affinität von Se^{2-} zu bestimmten Metallen, die auch theoretisch zu erklären ist[45], sollte es ermöglichen, diese Inaktivierungsreaktionen des Selens zu erklären. Obwohl die Kenntnisse von Metallseleniden nur sehr mäßig sind - nur in der Sowjetunion scheint dieses Gebiet bearbeitet zu werden[24] - kann man annehmen, daß

diese, ähnlich wie die Metallsulfide, zu den unlöslichen Verbindungen zählen. Somit dürften als "Endprodukte" der Entgiftungsreaktionen Metallselenide der erwähnten Elemente im Stoffwechselgeschehen auftauchen, für die es im wesentlichen nur zwei Wege gibt: die Ausscheidung in den Faeces oder die Ablagerung in den Zellen. Viele der Experimente belegen diese Erwartung, besonders letztere.
Daß es sich hierbei um Reaktionen handelt, die eine Systemstabilisierung anstreben, ergibt sich ebenso aus der Tatsache, daß fast alle der angeführten Elemente ihrerseits die Toxizität von zu hohen Selengaben in vivo deutlich herabsetzen können.

1.2.2.2.1. Selen und Quecksilber

Der Schutzeffekt von Selen bei Quecksilbervergiftungen ist einerseits bei anorganischen Quecksilberverbindungen (meist $HgCl_2$) und andererseits bei organischen Quecksilberverbindungen (meist Methylquecksilber) untersucht worden. Zunächst sollen die Untersuchungen mit anorganischem Quecksilber betrachtet werden.
PARIZEK und seine Gruppe haben als erste den Schutzeffekt von Selen bei Sublimatvergiftungen ($HgCl_2$) an Ratten untersucht[46]. In ihren Untersuchungen konnten sie zeigen, daß Selenit Schutz vor den Folgen einer Sublimatvergiftung bietet. Letztere zeichnet sich durch Nekrosen der Niere aus und führt letzten Endes zum Tod. Dabei zeigte nur Selenit, nicht jedoch Sulfit, einen deutlichen Effekt: während bei äquimolaren Dosen von Selen zu Quecksilber 97,5 % der Ratten überlebten, waren es bei Ersatz von Selenit durch Sulfit nur 5 % gegenüber 3,3 % der Kontrolle. Ebenso konnten sie nachweisen, daß Selenitgaben einen erhöhten Quecksilberspiegel in den Geweben[47] zur Folge hatten. Sie bemerkten auch, daß immer jeweils äquimolare Mengen von Quecksilber und Selen für einen optimalen Schutz notwendig sind[48].
GROTH et al.[49] haben ebenso mit Ratten den antagonistischen Effekt von Quecksilber und Selen untersucht. Sie fanden,

daß die Anreicherung von Quecksilber im Gewebe bei Sublimatgaben allein nur etwa 7-fach war, dagegen deutlich höher, wenn zusätzlich Selenit gegeben wurde. Sie wiesen auch darauf hin, daß Quecksilbergaben ihrerseits vor den toxischen Effekten von Selen schützen. Mit Hilfe der Elektronenstrahlmikroanalyse konnten sie auch nachweisen, daß sich Anhäufungen von Hg-Se-Aggregaten in den phagozitierenden Zellen des reticuloendothelialen Systems befanden, möglicherweise die Produkte der in vivo Reaktion der beiden Elemente. POTTER und MATRONE[50] fanden bei mit Selenit gefütterten Ratten, daß Gaben von $HgCl_2$ die Menge von Quecksilber in Leber und Milz signifikant erhöhten; zugleich fanden sie, daß diese Verteilung des Quecksilbers sich schwerpunktsmäßig durch Selengaben umverteilt. Sulfat und Sulfit hatten keinen Schutzeffekt. MOFFITT und CLARY[51] konnten ebenso eine Steigerung der Quecksilberaufnahme in den Organen Leber und Milz nach Selenitgaben bei Ratten finden, hinzu kam der Befund, daß Selenit zugleich eine Akkumulierung von Quecksilber in den Nieren verhindert. Zusätzlich bemerkten sie, daß äquimolare Mengen an Quecksilber und Selen notwendig sind, um einerseits eine maximale Bindung an Blutbestandteile sowie die oben erwähnten Organe zu erhalten, andererseits zugleich eine minimale Speicherung in der Niere. Weitere Aufklärung über die molekularen Grundlagen der Selen-Quecksilberwechselwirkung brachten die Arbeiten der Gruppen von CHEN et al.[52] und BURK et al.[53]. Sie fanden ebenso einen Umverteilungsvorgang des Quecksilbers durch Selen, bei gleichzeitiger Erhöhung der Quecksilberaufnahme. CHEN et al. wiesen eine Erhöhung des Quecksilbergehaltes im Blut, in den Testes sowie in der Leber und eine Erniedrigung in den Nieren nach. Während das Quecksilber ohne Selengaben an niedermolekularen Plasmaproteinen, möglicherweise Metallothionin, gebunden wird und dabei an 3 verschiedenen Proteinfraktionen auftaucht, ergibt sich bei gleichzeitigen Selenitgaben, daß das Quecksilber auf nur 1 höhermolekulares Protein umgelagert wird. BURK et al. haben sich gezielt mit diesem einen Plasmaprotein befaßt, wobei sie Ratten simultan Selenit und

$HgCl_2$ injiziert haben. Dabei fanden sie eine 15fache Anreicherung des Quecksilbers in dieser Proteinfraktion und gleichzeitig ein molares (1:1) Verhältnis von Hg und Se. Mit dem antagonistischen Effekt von Hg und Se bei Hühnern hat sich hauptsächlich HILL[54] beschäftigt. Seine Betrachtung geht dabei von der Tatsache aus, daß $HgCl_2$-Gabe die Toxizität von Selenit in zu hohen Dosen reduziert. Auch er kam zu der Erkenntnis, daß der Schutzeffekt maximal bei äquimolaren (1:2) Konzentrationen von Hg zu Se erreicht wird. Um nachzuweisen, welche nichttoxische Komponente der Körper bilden kann, verfütterte er HgSe und bemerkte, daß es nicht so giftig ist wie Selenit bei gleichen Dosen.
Eine weitere Gruppe, die bei diesen Toxizitätsstudien untersucht wurde, umfaßt Seetiere und Fische. Dabei wurde festgestellt, daß Seetiere natürlicherweise erhöhte Quecksilbermengen enthalten, diese aber sehr wahrscheinlich in der biologisch wenig toxischen Form der HgSe-Komplexe[55]. Thunfisch reichert dabei wahrscheinlich das Selen aus dem Meerwasser an, um einer Quecksilbervergiftung vorzubeugen[56]. Dabei wurde auch nachgewiesen, daß es sich bei diesem Schutzmechanismus um einen wechselseitigen Effekt zwischen Se und Hg handelt. Die Leber von Seetieren, die mit Fisch, der 40mal mehr Selen als Quecksilber enthielt, gefüttert wurden, enthielt gleichmolare Mengen an Selen und Quecksilber (1:1-Verhältnis)[57]. Auch von Süßwasserfischen ist bekannt, daß sie relativ hohe Mengen von Quecksilber und Selen enthalten[58].
Ebenso bei Menschen wurde dieser antagonistische Schutzeffekt von Quecksilber und Selen gefunden. So fanden PERRY et al.[59] bei Minenarbeitern, daß das Verhältnis von Hg zu Se, noch lange nach Eintritt in den Ruhestand, immer 1:1 in den verschiedensten Geweben war. Dieses kann als ein Hinweis auf den Antidot-Effekt dieser beiden Elemente füreinander gelten. Interessanterweise berichteten unabhängig davon KOSTA et al.[60] von einer ähnlichen Untersuchung in Slovenien. Bei Minenarbeitern, die hohe Dosen von anorganischem Hg ausgesetzt waren, war die Hg-Menge im Körper etwa 1000-fach und bei Bewohnern der Gegend etwa 10-fach

gegenüber dem normalen Spiegel erhöht. Dabei ergab sich folgende (absteigende) Reihenfolge der Organverteilung: Schilddrüse, Hypophyse, Niere, Gehirn. Die Neutronenaktivierungsanalyse von post-mortem-Proben von Minenarbeitern ergab dabei für alle untersuchten Gewebe eine hochsignifikante Stoechiometrie von 1:1 für das Verhältnis von Hg und Selen. Diese so strenge Parallelität der Akkumulation von Hg und Se deutet auch hier auf einen natürlichen Schutzmechanismus beim Menschen hin.

Neben diesen Untersuchungen gewinnen in letzter Zeit auch die der Ernährungswissenschaftler an Bedeutung. Hier ist eine Studie von BOMBACE et al.[61] von Interesse. Sie untersuchten die biologische Verfügbarkeit von Selen in einem Gebiet Italiens (Amiata), in dem intensiver Bergbau (Tiemannit (HgSe) und Onofrit (Hg, Se, S)) betrieben wird. Dabei zeichnete sich ab, daß die Verfügbarkeit von Selen relativ gering ist, was man als weiteren Beweis für die relative Ungiftigkeit und biologisch nicht verwertbare Form von HgSe ansehen kann.

Ein etwas anderes Bild bietet der wechselseitige Effekt von Selen mit organischen Quecksilberverbindungen. Als erst untersuchte die Gruppe aus Wisconsin[55] die antagonistische Wirkung von Selen gegenüber Methylquecksilbervergiftungen in der Ratte. Daneben fanden sie, daß eine 17 % Beigabe von getrocknetem Thunfisch, der zwischen 2 bis 3 ppm Selen enthielt, zu einer Selenmangeldiät, die Toxizität von Methylquecksilber bei Japanischen Wachteln verhindern konnte. Methylquecksilber zeichnet sich durch eine ausgeprägte Neurotoxizität aus. POTTER und MATRONE schildern die Symptome wie folgt: bei Beginn zeigen Ratten, wenn man sie am Schwanz anhebt, gekreuzte Beine mit geballten Zehen, dann beginnt ein fortschreitender Verfall der Bewegungskontrolle (zuerst das hintere Viertel, dann die Vorderbeine), begleitet von zunehmender Übererregbarkeit und Tendenz zu unsystematischen spastischen Bewegungen; kurz vor dem Tod sind die Tiere völlig unbeweglich und zeigen oft Nasenbluten. Die typischen Symptome konnten durch Selenitgaben vollständig

aufgehoben werden. Zudem konnten sie zeigen, daß auf molarer Basis Methylquecksilber bedeutend giftiger als $HgCl_2$ ist. Auch wurde wiederum ein Umverteilungseffekt des Quecksilbers im Körper durch Selen gefunden, dieser Effekt war jedoch nicht bei den Nieren zu finden. Dieses und weitere Anzeichen deuten auf einen anderen Metabolismus von organischen Quecksilberverbindungen hin. So fanden CHEN et al.[62], daß Methylquecksilber nicht an Thionin bindet, was für $HgCl_2$ der Fall ist. FANG[63] untersuchte den Metabolismus von verschiedenen organischen Quecksilberverbindungen (Phenylquecksilberacetat, Äthylquecksilberchlorid und Methylquecksilberchlorid). Er fand, daß von den untersuchten Stoffen nur Phenylquecksilberacetat ein Enzymsystem in der Leber induziert, das die C-Hg Bindungen spaltet. Damit war ein Effekt gefunden, der für organische Quecksilberverbindungen deutlich verschieden von dem für organische ist. Zu diesen Befunden kommt noch der von HILL[54] hinzu, der neben dem Schutzeffekt von Selenit vor Phenylquecksilberacetatvergiftungen bei Hühnern auch eine deutliche Änderung in der Stoechiometrie von 1:4 für Se zu Hg (im Gegensatz von 1:1 bei anorganischem Hg) fand.

Bei Menschen ist spätestens seit der Minamata-Affäre in Japan die Giftigkeit von Methylquecksilber gefunden worden. Untersuchungen von menschlichem Material aus diesem Gebiet konnten keine Korrelation von Quecksilber und Selen finden[64]. Eine andere japanische Gruppe[65] untersuchte den Metabolismus von Methylquecksilber in menschlichem Blut und Rattengewebe. Sie konnten nachweisen, daß Selenit an der Freisetzung von Methylquecksilber, das an Sulfhydrylgruppen von Proteinen oder SH-haltigen Molekülen (Cystein, GSH) gebunden ist, beteiligt ist. Dabei kommt im Blut wiederum den Erythrocyten eine wichtige Rolle bei dieser Reaktion zu, diese konnte aber auch von Homogenaten aus Rattenleber, -niere oder -gehirn und aus Thunfisch-Muskel katalysiert werden. Dabei konnten aber auch sie keine Assoziation von Methylquecksilber und Selen beobachten. Für letzteres sprechen auch die Untersuchungen von WOOD[65], der gefunden hat, daß bei der Entgiftung durch Selenit von mit Methylquecksilber

vergifteten Tieren, Dimethylselenid ausgeatmet wird. Dabei nimmt er einen Methyl-Transfer vom Quecksilber zum Selen als wichtigen Reaktionsschritt an.

1.2.2.2.2. Selen und Cadmium

Die wohl zuerst beobachteten Symptome einer Cadmiumvergiftung bei Ratten sind die Schädigung der Testes. KAR und DAS[66] fanden 1963, daß Selenitinjektionen diesen Cd-Angriff auf die Testes verhindern. Einige Jahre später wurde dieser Effekt auch von MASON und YOUNG[67] untersucht, und sie fanden, daß die halbe Menge auf molarer Basis an Selen genügt, um bei minimalen aber schädlichen Konzentrationen von Cd diese toxische Wirkung aufzuheben. GUNN et al.[68] fanden einen gleichen Effekt bei Mäusen. Die durch Cd hervorgerufenen Schädigungen der Testes, die zunächst deren Gefäße betreffen (d.h. Blutungen hervorrufen), wurden durch Selenit, wobei die optimale Konzentration stets bei einem Verhältnis von 1:1 (Se:Cd) erzielt wurde, deutlich verhindert. Dabei führte die Selenitgabe aber auch zu einer Erhöhung der Testes-Konzentration sowohl von Selen als auch von Cadmium, was vermuten ließ, daß es sich um einen Cd-Se-Komplex handelt. Ähnliches fanden auch PARIZEK et al.[48] in Rattengewebe.

PERRY et al.[59] verwiesen erstmals auf die bei Menschen beobachtete Korrelation von Cadmiumintoxikation und Bluthochdruck. Deswegen untersuchten sie dieses Symptom bei Ratten und fanden, daß ein durch 2,5 und 10 ppm Cd bedingter Hochdruck durch 3 ppm Se behoben werden konnte.

HILL[54] beobachtete eine Wachstumsverminderung bei Hühnern, die durch Cd ausgelöst wurde. Bei äquimolaren Dosen von Cd und Se konnte dieser Effekt verhindert werden. Die wechselseitigen Effekte von Cd und Se in Rattengeweben wurden dann etwas mehr auf molekularer Ebene von CHEN et al.[69] untersucht. Dabei konnte er folgendes differenzieren: Selen erhöht den Cd-Spiegel in Blut (22-fach) und Testes (3-fach), aber erniedrigt den Cd-Spiegel in Leber (um 48%) und Niere

(um 12 %). In allen Geweben, außer dem Plasma, ergab sich eine Umverteilung des Cd von Proteinen mit niedrigem (30 000) Molekulargewicht zu höherem (115 000) Molekulargewicht durch Selenitgaben. Im Plasma erfolgte dieser Effekt rein qualitativ gleich, jedoch an anderen, jeweils höhermolekularen Proteinen. Die genauen Verhältnisse bei den Plasmaproteinen der Ratte ergeben sich aus neueren Untersuchungen von GASICWICZ und SMITH[70]. Dabei haben sie sowohl in vivo als auch in vitro die Wechselwirkungen des Selens und des Cadmiums betrachtet. Sie fanden, daß bei simultaner Verabreichung von Cd und Se deren Plasmaspiegel bis zu 36-fach erhöht ist. Die Atomverhältnisse von Cd und Se waren stets 1:1, wobei diese im Komplex mit Proteinen von 330 000, 130 000 sowie 420 000 Molekulargewicht vorlagen. Bei den in-vitro-Versuchen konnten sie nachweisen, daß Selenit nicht selbst mit den Plasmaproteinen reagiert, sondern zuerst von den Erythrocyten (bereits nach 15 min.) metabolisiert werden muß, sodaß es in einer neuen Form zur Verfügung steht, die es gestattet, das Cd an Proteine zu binden. Dabei liegt ein Protein-gebundener Komplex von Cd und Se (1:1) vor, an dem ein Protein von 130 000 Molekulargewicht beteiligt ist. Ohne Selen wird das Cd an ein Protein mit 77 000 Molekulargewicht gebunden.

1.2.2.2.3. Selen und Arsen

Seit den Untersuchungen von MOXON 1938[71] weiß man, daß Arsen gegen die toxischen Effekte von Weizen mit zu hohem Selengehalt schützt. Sowohl Arsenit als auch Arsenat waren gegen die toxische Wirkung von Natriumselenit oder Selenocystin bei der Ratte effektiv[72]. Das gleiche fand man auch noch bei Schweinen, Menschen, Kühen und Hühnern[73]. Dabei entdeckte HILL, daß die Wirkungen von 5 und 10 ppm Selen als SeO_2, wie Wachstumsunterdrückung, durch gleiche Mengen von Arsenat aufgehoben wurden. Begleitet wird dieser Antidot-Effekt des Arsens gegenüber dem Selen von einem Wechsel des Ausscheidungsweges des Selens von der Lunge zum Gastro-

intestinaltrakt[74]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß sich die beiden Elemente dabei gegenseitig so beeinflussen, daß sie bevorzugt durch die Galle ausgeschieden werden[75]. Eine andere Erklärung für den wechselseitigen Effekt ergibt sich aus der Tatsache, daß Selen den Entkopplungseffekt von Arsen auf Mitochondrien aufhebt, wobei beide Elemente gegenseitig ihre Aufnahme durch diese Organellen behindern[76].

1.2.2.2.4. Selen und Kupfer

Auch beim Kupfer, das ebenso ein essentielles Spurenelement wie Selen ist, kommen bei Überdosierungen toxische Erscheinungen vor. Desgleichen kann Kupfer die toxischen Effekte von zu hohen Selendosen verhindern. HILL[54] hat letztere Wirkung des Kupfers bei Hühnern untersucht. Dabei fand er, daß die durch hohe Selengaben (40 ppm) erhöhte Mortalitätsrate durch Kupfergaben (500 ppm) beseitigt werden konnte; nicht beeinflußbar durch Kupfer war jedoch die Selen-bedingte Wachstumsverzögerung. JENSEN[77] hat sich ebenso mit der Wirkung von Cu auf die Selenvergiftungserscheinungen bei Hühnern beschäftigt. Er fand, daß Selen in Dosen von 40 ppm und höher ein reduziertes Wachstum und erhöhte Mortalität zur Folge hat. Kupfergaben in Höhe von 1000 ppm (als $CuSO_4$) konnten diese Effekte beseitigen. Durch die Kupfergaben fand eine Akkumulierung von Selen in der Leber statt, möglicherweise als Kupferselenid, während die Selenmenge in der Niere abnahm. Zugleich verwies er auf die Tatsache, daß Kupfer bei Hühnern auch Selenmangelerscheinungen wie Exsudative Diathese und Muskeldystrophie erzeugen kann. Mit letzterem Effekt beschäftigt sich JENSEN in einer weiteren Arbeit[78]. Hühner, deren Nahrung einen normalen Anteil von 0,2 ppm Selen enthielt, zeigten bei Gaben von 800 und 1600 ppm Cu deutliche Selenmangelerscheinungen und eine erhöhte Mortalitätsrate. Beides konnte durch Gaben von 0,7 ppm Selen (als Selenit) völlig aufgehoben werden.
GODWIN et al.[79] stellten bei Ratten, die eine Selenmangeldiät erhielten, eine ungewöhnliche Toxizität von Kupfer

fest. Während Ratten normalerweise Cu-Mengen bis zu 500 ppm gefahrlos überstehen, zeigten diese Selen-Mangel-Ratten schon bei 50 ppm Cu starke toxische Erscheinungen. Bereits 3 bis 24 h nach einer solchen Cu-Injektion starben diese Tiere, während Selen-supplimentierte Tiere keinerlei Wirkung bemerken ließen. Die erhöhte Mortalitätsrate war begleitet von den typischen Erscheinungen einer Kupferintoxikation: Hämolytische Krise und Hämoglobinurie.
Mit den toxischen Erscheinungen von Kupfervergiftungen beim Schaf beschäftigte sich HOWELL[80]. Den Verlauf gliedert er in 2 Phasen. In der ersten Phase tritt eine Kupferakkumulierung in der Leber und Niere ein, wobei stärkere histologische Veränderungen an der Leber auftreten, begleitet von einem erhöhten Serumspiegel an Enzymen (z.B. Creatin-Phosphokinase). Die zweite Phase ist durch eine akute Erkrankung der Tiere gekennzeichnet: Hämoglobinämie, Methämoglobinämie, Hämoglubinurie und Gelbsucht; daneben findet man ein Absinken des Glutathionspiegels im Blut und zuletzt tritt Lebernekrose ein. Selengaben konnten bereits in der ersten Phase die Erscheinungen mildern, so fand z.B. eine deutliche Verringerung des Anstiegs des Serumspiegels an Creatin-Phosphokinase statt.

1.2.2.2.5. Selen und Zink

Zink zeigt eine deutliche Wechselwirkung mit Kupfer in Tieren und hat zudem ähnliche chemische Eigenschaften. Deswegen hat JENSEN[78] neben Kupfer auch den Effekt von Zink auf den Selenstoffwechsel bei Hühnern untersucht. Er konnte bei Hühnern mit normaler Ernährung (0,2 ppm Selen) durch Gaben von 2100 oder 4100 ppm Zink (als $ZnSO_4$) hohe Mortalitätsraten und ein erhöhtes Auftreten von Exsudativer Diathese und Muskeldystrophie feststellen. Zudem war bei diesen Zinkmengen die Gewichtszunahme verringert. Mit Gaben von 0,7 ppm Selen (als Selenit) konnten diese Selenmangelerscheinungen - nicht jedoch die Wachstumsverzögerung (s.a.[83]) - und die Mortalität behoben werden. Möglicherweise geschieht die Re-

aktion von Selen und Zink im Verdauungstrakt oder im Gewebe, wobei eine Form des Selens entsteht, die biologisch nicht mehr verfügbar ist, z.B. für den Einbau in das Enzym Glutathionperóxidase, da dieses bei Exsudativer Diathese in Hühnern erniedrigt ist[89].

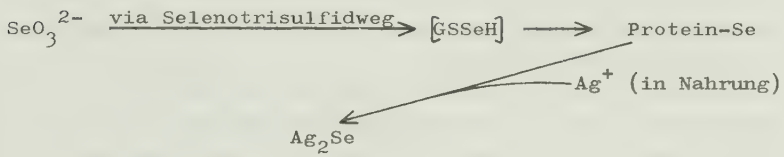
1.2.2.2.6. Selen und Blei

Die Möglichkeit einer Schutzwirkung von Selen gegen Bleivergiftungen wurde bisher nur theoretisch in Analogie zu anderen Schwermetallen erörtert und nicht in gezielten Experimenten erwähnt[23,24].
Neueste Untersuchungen bei Hühnern durch BELL et al.[82] konnten diese Erwartungen konkretisieren. Bei Hühnern mit Ernährung durch eine Selen-Mangel-Diät konnten Gaben von 250 ppm Blei (als Bleiacetat) die typischen Erscheinungen wie Exsudative Diathese und Wachstumsverzögerung verstärken. Wenn zu dieser Ernährung Selen (0,1 ppm) zugegeben wurde, ließ sich folgendes beobachten: Blei hat einen Einfluß auf die Selenverteilung zwischen den Organen und die Menge von Pb in denselben wird von Selengaben erhöht. Das Gehirn verhält sich in dieser Hinsicht jedoch nicht so wie die anderen Organe.

1.2.2.2.7. Selen und Silber

Da dem Silber als Selenantagonisten in dieser Arbeit eine besondere Rolle zukommt, sollen die Effekte, die Silber im biologischen Geschehen verursacht, gesondert beschrieben werden. Hier sollen nur diejenigen Experimente beschrieben werden, die eine eindeutige Wechselwirkung des Silbers mit dem Selen nachgewiesen haben.
Eine der ersten unbeabsichtigten Beschreibungen der Wechselwirkung von Silber und Selen im tierischen Organismus stammt von SHAVER und MASON[84] aus dem Jahr 1951. Da jedoch damals Selen noch nicht als essentielles Spurenelement be-

kannt war, konnte man die beschriebenen Effekte von Silbersalzen auf Ratten nur als Symptom eines Vitamin-E-Mangels erklären. Im Jahr 1971 konnten dann DIPLOCK et al.[85] eine Erklärung dieser Symptome aufgrund der nun bekannten Tatsache geben, daß Selen ebenso wie Vitamin E essentiell ist und beide teilweise gleiche Schutzeffekte bei Tieren zeigen. Er stellte fest, daß diese Erscheinungen gut mit der außergewöhnlichen Affinität von Ag^+ für Se^{2-} zu erklären ist und daß das Silber möglicherweise mit Protein-gebundenem Selenid reagiert. Dabei stellte er folgendes theoretisches Modell für die Vorgänge in der Rattenleber auf:



GANTHER et al.[56] fanden, daß Silbernitrat den Eintritt der Lebernekrose bei Ratten beschleunigt, die mit einer Vitamin E-Mangel-Diät gefüttert wurden. Daraufhin postulierten sie 2 Möglichkeiten, wie Selen gegen Schwermetallvergiftungen wirken könnte: 1. Wenn Selen nicht in genügender Menge verfügbar ist, findet eine Inaktivierung von essentiellen Selenkomponenten, wie der Glutathionperoxidase, statt; Selenitgaben können dies verhindern. 2. Wenn Selen im Überfluß vorhanden ist, kann es zusätzlich in Proteine eingebaut werden, die eine hohe Affinität für Schwermetalle (z.B. Ag^+) haben und letztere somit von den essentiellen Selenkomponenten fernhalten. Die Gruppe in Wisconsin hat inzwischen versucht, dieses Postulat durch Experimente zu verifizieren. Dabei untersuchten sie den Einfluß von Selenit auf die GSH-Peroxidaseaktivität bei Silbervergiftungen der Ratte[86]. Hierzu wurden Ratten mit Selenmangelernährung (0,02 ppm Se) und Selen-supplementiale (0,5 ppm Se) mit verschiedenen Ag^+-Konzentrationen (0-751 ppm) behandelt

und jeweils die GSH-Peroxidaseaktivität in Leber, Niere, Gehirn und Erythrocyten bestimmt. Folgendes ließ sich dabei feststellen: Bei hohen Silbermengen (751 ppm Ag) und niedrigem Selenspiegel war das Wachstum deutlich verringert und 4 von 10 Ratten starben; Selenitzusatz steigerte das Wachstum und die Überlebensrate gegenüber den Werten, die bei Selenmangel und 76 ppm Ag^+ erreicht wurden; Selengaben steigerten die Silbermengen in der Leber um das 2- (bei 76 ppm Ag^+) bis 3-fache (bei 751 ppm Ag^+). Bei Ratten mit ausreichender Selenversorgung (0,5 ppm) zeigten Gaben von 751 ppm Ag^+ signifikante Abnahmen der Glutathionperoxidase in der Leber (auf 5 %), den Erythrocyten (auf 37 %) und den Nieren (auf 38 %). Dabei konnten diese Experimente jedoch keinen Aufschluß darüber geben, welche Mechanismen diese Abnahme der Enzymaktivität zugrunde lag. Als Möglichkeiten wurde eine direkte Inhibition des Enzyms oder eine Beeinträchtigung der Biosynthese angesehen. Der Mechanismus der Schutzwirkung von Selen bei Silbertoxizität beruht sicher nicht darauf, daß die Silbermenge in den Geweben verringert wird, da die Experimente das Gegenteil beweisen.
Die Wechselwirkung von Silber und Selen bei Hühnern wurde von JENSEN[78,87] untersucht. Dabei stellte er fest, daß Ag^+-Gaben bei Hühnern Exsudative Diathese verursachen und dieser Effekt durch Selengaben beseitigt werden kann. Da nachgewiesen ist, daß Exsudative Diathese bei Hühnern von einer Abnahme der GSH-Peroxidase begleitet ist[88], nahm auch er an, daß eine Wirkung des Silbers sicherlich in der Verringerung der Glutathionperoxidase-Aktivität besteht. In einer weiteren Arbeit[77] untersuchte er, inwieweit Silber die Selentoxizität - und umgekehrt - unterbinden kann. Dabei wurden Hühnern jeweils mit 0, 5, 10, 20, 40 und 80 ppm Selen (als Na_2SeO_3) in der Nahrung gefüttert und jeweils die Effekte von 1000 ppm Silber (als $AgNO_3$) untersucht. Selenmengen von größer 5 ppm schlugen sich in einer Wachstumsverzögerung und erhöhter Mortalität nieder; das gleiche war ohne Selengaben auch durch die Silbergaben zu erreichen. Wurde Silber gegeben, so zeigten zunehmende Mengen an Selen auch eine Zunahme des Wachstums; andererseits verhinderten Silbergaben

die Wachstumsverzögerung und erniedrigten die Mortalitätsrate von zu hohen Selengaben. Die Untersuchung der Selenmengen in der Leber in Abhängigkeit von dem Selengehalt der Nahrung ergab ein Maximum bei 10 ppm Selen. Gleichzeitig verfüttertes Silber verringerte bei Mengen bis 10 ppm und erhöhte ab 20 ppm Selen den Selengehalt der Leber. Damit deutet einiges darauf hin, daß Silber sowohl die Absorption von Selen im Verdauungstrakt beeinträchtigt, als auch die Anhäufung von Selen im Gewebe fördert. Es wird vermutet, daß dabei jeweils eine recht unlösliche und deswegen wenig toxische Verbindung von Ag und Se entsteht und diese dürfte möglicherweise Silberselenid sein.
Ein Effekt, der schon relativ früh entdeckt wurde, ist die Tatsache, daß Silber bei Mitochondrien die gleichen Erscheinungen hervorruft wie Selenmangel[89]. Typisch für Mitochondrien von Selenmangelratten ist das Schwellen[36] und die sogenannte "respiratory decline", das ist die Eigenschaft von isolierten Mitochondrien, vorzeitig (nach etwa 30 min, d.h. 1/4 der Zeit) die Sauerstoffaufnahme zu beenden. Beides wurde gefunden, wenn Mitochondrien mit Ag^+ inkubiert wurden. RILEY und LEHNINGER[90] fanden eine deutliche Beziehung zwischen Silbermenge und dem Grad des Schwellens der Mitochondrien. SCHWARZ[89] fand deutliche Zeichen von "respiratory decline" bei der Einwirkung von Ag^+ (außerdem auch bei Hg^{2+}, Cd^{2+}) auf isoliertes Lebergewebe. MORRIS und LEVANDER[91] konnten bei solchem, durch Schwermetalle induziertem Schwellen der Mitochondrien durch Selenit eine eindeutige Hemmung dieses Vorganges beobachten.

1.3. Der Selenantagonist Silber

1.3.1. Das Element Silber

Da Silber zu den Edelmetallen gehört, ist es wegen seiner relativen Stabilität als reines Element schon recht lange den Menschen vertraut. Schon die Römer konnten es in erstaunlich reiner Form darstellen. Es stellt einen Anteil von et-

wa $6 \cdot 10^{-6}$ % der Erdkruste dar und das wichtigste Erz ist der Silberglanz (Argentit) Ag_2S. Diese Verbindung ist zugleich auch eine der beständigsten und unlöslichsten des Silbers, ihr Löslichkeitsprodukt ist 10^{-50} Mol^3/l^3.

1.3.2. Pharmakologie des Silbers

Die Anwendungen von Silber und seinen Salzen in der Medizin sind sehr alt und finden heute kaum noch Anwendung. Silbernitrat wurde zur Beseitigung von Wucherungen der Haut ("Höllenstein") benutzt, da es auf Haut oxydierend und ätzend wirkt. 0,5 %ige $AgNO_3$-Lösungen finden Verwendung in der Gonorrhöprophylaxe des Auges bei Neugeborenen. Bei der Behandlung mit Silbersalzen (früher bei Ulcus ventriculi et duodeni) kam es zu der sogenannten Argyrie; das ist eine Ablagerung von Ag_2S (feine schwarze Körnchen) in der Lederhaut und verschiedenen Organen (z.B. Nieren), wobei das gebildete Ag_2S nicht mehr schädlich für die Zellen war.
Metallisches Silber in kolloidaler Form (Kollargol) hat bakteriostatische Eigenschaften, die auf der Tatsache beruhen, daß Silber an der Oberfläche ständig mit einem sehr dünnen Oxidfilm bedeckt ist, aus dem in Wasser Silberionen freigesetzt werden können.

1.3.3. Silber-Vorkommen in der Biosphäre

Obwohl von Silber keine biologische Funktion nachgewiesen ist, kommt es in Menschen und Tieren in meßbaren Mengen vor. Im Humanserum ist Silber stets anwesend, dabei liegen die Werte zwischen 0,5 und 16,0 µg Ag/l [92]. In der UdSSR wurden im Blut 43,5 µg Ag/l [93] und ebenso 3,4 mg Ag/l [94], wie auch 12,2 µg Ag/l [95] gefunden. LIFTSHITS hat in einer weiteren Arbeit[96] die einzelnen Blutbestandteile untersucht und fand: im Plasma etwa 2 µg Ag/l im Gesamtprotein, die Globulinfraktion enthielt jedoch mehr (6,4 µg Ag/l) Silber; bei den Erythrocyten konnte er im Stroma 3,8 µg Ag/l und den Proteinen (ohne Hämoglobin) 0,9 µg Ag/l nachweisen.

Die meisten anderen Untersuchungen beziehen sich auf das Gewicht des untersuchten Gewebes, meist jedoch nach Veraschung auf das Rückstandsgewicht. So fand WESTER[97] 6 - 245 • 10^{-4} µg Ag pro Gramm Gewebe bei menschlichen Herzen, MOZGOVAYA et al.[98] für Rinderleber 0,005-0,01 % Ag und für Rinderpankreas 0,0001-0,0003 % Ag des Veraschungsrückstandes. DINEVICH[99] konnte in veraschter Muttermilch 10^{-4} - 10^{-5} % Ag nachweisen.

1.3.4. Silber-Verhalten im tierischen Organismus

Von den bekannten Silbersalzen wurden nur $AgNO_3$ und Ag_2SO_4 im Verdauungstrakt absorbiert, für die anderen trifft dieses wegen ihrer geringen Löslichkeit nicht zu. Hinzu kommt, daß auch noch das Sulfat und Nitrat im Verdauungstrakt in das schlecht lösliche Chlorid umgewandelt wird. Die LD_{50} liegt für $AgNO_3$ beim Kaninchen bei 0,008 g/kg Körpergewicht. Die toxischen Symptome einer Silbervergiftung (mit 5-20 mg Ag/l Trinkwasser) bei der Ratte werden mit Übererregbarkeit, Bewegungsstörungen und in späterer Phase einem totalen Verlust der bedingten Reflexe beschrieben[100]. Intravenöse Injektionen von Ag^+ rufen Hämolyse und Agglutanation der Erythrocyten hervor[101]. Der Mensch, der nachweislich täglich 1,6 µg Ag^+/l mit dem Harn ausscheidet, gibt oral aufgenommenes Ag^+ hauptsächlich mit den Faeces ab[92]. FURCHNER et al.[102] haben nach Gaben von radioaktivem Silber (i.v. und i.p. Injektionen, sowie oral) bei Mäusen, Ratten, Affen und Hunden die Verteilung untersucht. Sie fanden, daß 90 % des Silbers nicht absorbiert wird und mit dem Faeces ausgeschieden wird. In einem ähnlichen Versuch bei Ratten[103] wurde zunächst eine gleichmäßige Verteilung im Organismus (nur das reticuloendotheliale System war angereichert) gefunden und innerhalb von 4-5 Tagen konnten 91,3 % des verabreichten Silbers in den Faeces nachgewiesen werden. Das im Körper verbleibende Silber wird an Plasmaproteine gebunden und zunächst in der Leber akkumuliert und von hier aus der Ausscheidung zugeführt[104]. Der Rest wird in Silbersul-

fid eingebaut und im Gewebe abgelagert. Bei Ratten und Kaninchen wird ein Teil in den Nieren und da besonders in der glomerulären Basalmembran abgelagert[105]. Untersuchungen mit Röntgenstrahlenbeugung ergaben, daß das Silber dieser Ablagerungen mit Schwefel kombiniert ist[106].
Untersuchungen bei Hühnern haben gezeigt, daß Silber auch antagonistisch zu Kupfer wirken kann, da es dort die Symptome eines Kupfermangels verursacht[107].

1.3.5. Zur Biochemie des Silbers

Silber dient in der Biochemie zur Titration von Thiolen und Disulfiden. Besonders in der Proteinchemie sind die Reaktionen von Silber intensiv untersucht worden. CECIL und McPHEE[108] haben hierzu einige grundlegende Untersuchungen gemacht. Sie stellten auch jene für Disulfide formal abgeleitete Reaktionssequenz auf, die resultiert, wenn Disulfide unter milden Bedingungen mit Ag^+ reagieren:

$$2\ RSSR + 3\ Ag^+ + 2\ OH^- \longrightarrow 3\ RSAg + RSO_2H + H^+$$

Daneben entdeckten sie auch, daß neben dieser Reaktion auch eine solche stattfindet, bei der ein Bruch der C-S-Bindung auftritt.
Die Wechselwirkung von Ag^+-Ionen mit verschiedenen Aminosäuren hat GRUEN[109] untersucht. Er fand, daß zwar hauptsächlich Cystein, aber auch Lysin, Arginin und Methionin (mit ihrer NH_2-Gruppe) mit Silber reagieren können. Ag^+ kann ebenso in Proteinen mit deren Tryptophanresten einen schwachen Komplex bilden, der eine besondere Phosphoreszenz zeigt[110].
In einer tabellarischen Zusammenstellung hat WEBB[111] den sicher biochemisch relevantesten Einfluß der Silberionen, den der Inhibition von Enzymen zusammengestellt. Er vermerkt dabei, daß Silberionen neben Quecksilberverbindungen die wohl größte Wirksamkeit besitzen. Die Hemmwirkung von Ag^+ auf Enzyme ist mehrfach untersucht worden. Mindestens

58 Enzyme werden laut Literatur[111,112] als durch Ag^+ hemmbar beschrieben. Aus der Vielfalt von Daten lassen sich folgende allgemeine Feststellungen treffen. Die meisten dieser Enzyme sind Oxidoreduktasen, z.B. Glutamat-Dehydrogenase[115], Malat-Dehydrogenase[116], Alkohol-Dehydrogenase[117], D-Aminosäure-Oxidase[118], Katalase[119], Glucose-Oxidase[121], Xanthinoxidase[120], Pyruvat-Dehydrogenase[122]. Von den 58 beschriebenen Enzymen sind 23 entweder Metalloenzyme oder metallabhängige Enzyme. Ein Teil ist am Stoffwechsel energiereicher Phosphate beteiligt, z.B.: ATPase[123], Creatinkinase[111]. Die Hydrolasen und Lyasen stellen die zweitgrößte Gruppe der durch Ag^+ hemmbaren Enzyme dar, z.B.: Urease[124], Trypsin[125], Chymotrypsin[126], Glutaminase[113], Aldolase[111], Pyruvat-Decarboxylase[111]. Ebenso läßt sich eine Unterteilung nach der Art der Hemmung aufstellen. So werden z.B. folgende Enzyme vollständig gehemmt[111]: Aldolase, Carboanhydrase, Creatinkinase, Urocanase, Aspartase. Wiederum andere werden nur teilweise gehemmt, z.B.: α-Amylase, Pyruvat-Decarboxylase, ß-Galactosidase[111], Fructose-1,6-Diphosphatase[116], Urease[124]. Von einigen ist auch die Reversibilität (meist durch SH-haltige Verbindungen) der Hemmung bekannt, z.B.: Glucuronidase[127], Trypsin[125], Chymotrypsin[126], Invertase aus Hefe[128]. Bei fast allen diesen Enzymen wird angenommen, daß die Wirkung des Silbers an den SH-Gruppen im Enzym stattfindet, lediglich vom Trypsin[125] und Chymotrypsin[126] nimmt man an, daß das Silber mit Histidinresten in Wechselwirkung tritt. Da sich aus diesen Daten kein generelles Schema für den Mechanismus der Silberinhibition ableiten läßt, soll am Beispiel einiger exemplarisch untersuchter Enzyme das von ihnen bekannte vorgestellt werden.

ROGERS[117] fand, daß Alkohol-Dehydrogenase nach Behandlung mit Silbernitrat die katalytische Aktivität deswegen verliert, weil Silber nicht nur mit den SH-Gruppen reagiert, sondern ebenso einen Konformationswechsel des Proteins bewirkt. ROSENBLOOM et al.[129] untersuchten die Inaktivierung von Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch Silber. Dabei bemerkten sie, daß das Enzym, während es an Aktivität verlor, eine kleinere Sedimentationskonstante (3,0 statt 7,7)

bei der Ultrazentrifugation aufwies. Ebenso zeigte das Fluoreszenzspektrum deutliche Veränderungen. Bei einem molaren Verhältnis von Ag^+ zu Enzym von 1:1 war das Enzym zur Hälfte gehemmt und die andere Hälfte in Untereinheiten zerfallen; bei einem Verhältnis von 4:1 waren 20 % gehemmt und es zeigte sich eine Abnahme der Fluoreszenz bei 430 nm und bei 16:1 war das Enzym total gehemmt. Aus weiteren Untersuchungen ergab sich der Schluß, daß die Hemmung der Enzymaktivität mit der Dissoziation des Proteins einhergeht.

HELLERMAN et al.[118] untersuchten die Silberwirkung auf D-Aminosäure-Oxidase. Sie fanden eine lineare Abhängigkeit der Hemmung von der Silbermenge pro Protein und eine totale Hemmung bei etwa 6 Molen Ag^+ pro Mol Enzym. Genauere Untersuchungen brachten sie jedoch zu der Feststellung, daß im Einzelfall für jedes Proteinmolekül die Hemmung ein Alles-oder-Nichts-Ereignis ist, bei dem zugleich ein drastischer Wandel in der Proteinkonformation eintritt. Sie prägten für diese Hemmung den Begriff "selektive Inhibition".

HIGASHIDA et al.[130] versuchten den Mechanismus der Silberhemmung der mitochondrialen Malat-Dehydrogenase aufzuklären. Sie fanden, daß diese irreversible Hemmung an den SH-Gruppen des Enzyms angreift. Dabei wird die Konformation verändert, wie CD-Messungen zeigten, und gleichermaßen die katalytische Aktivität beeinflußt.

1.3.6. Reaktionen von Silber mit Selenverbindungen

Arne FREDGA[131] hat sich bereits Anfang der 30iger Jahre mit organischen Selenverbindungen beschäftigt. Sein Interesse galt in erster Linie Diseleniden und Diselenodicarbonsäuren. Als eine der beständigsten Verbindungen stellte er Diselen-di-laktylsäure dar und untersuchte die Wirkung von Ag_2SO_4 auf diese Verbindung. Da die Silbermenge, die für eine normale Salzbildung benötigt wird, deutlich überschritten wurde, gelangte er zu dem Schluß, daß eine zweite Reaktion des Silbers mit den Diselenodicarbonsäuren er-

folgen muß. Er fand eine Erklärung durch folgenden Mechanismus, der eine Disproportionierung der Verbindung durch Silberionen fordert:

$$2\ R\text{-}Se\text{-}Se\text{-}R + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ R\text{-}SeH + R\text{-}SeOOH$$

Während die Selenide fähig sind, weiter mit dem Silber unter Ausbildung einer Mercaptidverbindung zu reagieren, bleibt die entstandene Seleninsäure unumgesetzt, so daß sich folgendes Schema ergibt[132]:

$$2\ R\text{-}Se\text{-}Se\text{-}R + 3\ Ag^+ + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ R\text{-}Se\text{-}Ag + R\text{-}SeOOH + 3\ H^+$$

Die Diselencarbonsäuren waren ebenso in der Lage, mit unlöslichen Silberverbindungen (wie AgCl, Ag_2O) zu reagieren. Interessanterweise konnte diese Reaktion nur noch mit Hg^{2+}-Salzen, nicht jedoch mit Cu^{2+}, Pb^{2+} oder Bi^{3+}-Salzen erhalten werden[133].

Bei einer weiteren Gruppe von Selenverbindungen, den Selenoharnstoffen, wurde ebenso eine Reaktion mit Silbersalzen beobachtet. LIPP et al.[134] fanden bei verschiedenen Selenoharnstoffderivaten, daß Einwirkung von Silbernitratlösung einen Niederschlag von Ag_2Se zur Folge hat. Eine ähnliche Zersetzungsreaktion von Selenoharnstoffen fand ROSENBAUM[135]. N,N'-Diisopropylselenoharnstoff reagiert mit Silbernitrat zu N,N'-Diisopropylharnstoff und Silberselenid nach folgendem Schema:

$$C_3H_7NH\text{-}CSe\text{-}NHC_3H_7 + 2\ AgNO_3 + H_2O \longrightarrow C_3H_7NH\text{-}CO\text{-}NHC_3H_7 + Ag_2Se + 2\ HNO_3$$

Ebenso können Silbersalze bei der Herstellung von Selenoorganischen Verbindungen benutzt werden[136]:

$$2\ CF_3COOAg + 2\ Se \xrightarrow{280^\circ} CF_3\text{-}Se\text{-}CF_3 + 2\ CO_2 + Ag_2Se$$

Bei dieser Reaktion entstehen in einer Nebenreaktion ebenso die entsprechenden Diselenide.

1.4. Selenantagonismus und Krebs

Die Frage, ob Selen Krebs erzeugt oder verhindert, beschäftigt die Forscher schon geraume Zeit. Obwohl schon 1912 Selen in der Krebstherapie angewandt wurde, schienen Versuche im Jahr 1942 auf eine krebserzeugende Wirkung hinzuweisen[137]. Da diese Frage wohl eine der wichtigsten für die Ernährungswissenschaftler und den Umweltschutz darstellt, wurde sie bis heute heftig diskutiert[23,24] und war auch Thema von Übersichtsartikeln[137,138]. Während SCHRAUZER[138] und seine Kollegen Selen als Schutzfaktor vor Krebs ansahen, betrachteten andere[139] dieses Element mit gewisser Zurückhaltung. Hier soll jedoch nur das Problem der Krebsentstehung in Abhängigkeit von solchen Elementen aufgezeigt werden, die ebenso bereits als Selenantagonisten in Erscheinung getreten sind.

Eine rein statistisch aufgebaute Arbeit von SCHRAUZER et al.[140] weist darauf hin, daß ein überproportionales Verhältnis von Zink, Cadmium und Kupfer zu Selen in der Nahrung ein erhöhtes Krebsrisiko mit sich bringt. Sie vermuten, daß Selen seine Schutzwirkung vor Krebs dadurch entfalten kann, daß es in Wechselwirkung mit diesen Elementen tritt und dabei sowohl deren Aufnahme in den Körper behindert, als auch deren Inaktivierung im Körper bewirkt. SIROVER und LOEB[141] haben ein Testsystem entwickelt, das Aussagen über potentielle Mutagenität oder Krebserzeugung von Metallen gestattet. Dabei fielen die Elemente Silber, Cadmium und Blei als mögliche Krebserreger auf, also die Metalle, die auch als Selenantagonisten bekannt sind. Bei Versuchen mit Ratten ist nachgewiesen worden, daß Silber Krebs erzeugen kann [142,143]. Dabei sei noch auf einen Befund hingewiesen, daß

Silber sich in Tumoren anreichert[144]. Ein Schutzeffekt von Selen für Silberinduzierte Tumoren ist bis jetzt noch nicht untersucht worden; jedoch deuten die Versuche von SCHRAUZER et al.[145], die einen Schutzeffekt bei dem Selen-Antagonisten Zink gefunden haben, darauf hin, daß hier ein neuer Zusammenhang zwischen Krebsentstehung durch bestimmte Metalle und Selen als Schutzfaktor gefunden wurde. Diese Spekulation bezüglich der Funktion von Selen fand ebenso allgemeines Interesse[146], wobei auch auf die stimulierende Wirkung von Selen auf das Immunsystem hingewiesen wurde.

1.5. Ziele der Arbeit

Aus dem Konzept des Selenantagonismus von Schwermetallen soll versucht werden, dieses Phänomen auf molekularer Basis aufzuklären. Da in Tierversuchen ein klarer Zusammenhang zwischen Selenstoffwechsel und Schwermetallen nachgewiesen wurde, soll hier die Frage geklärt werden, inwieweit das Selenoenzym Glutathionperoxidase bei diesen Vorgängen beteiligt ist. Insbesondere eine Auswirkung von Schwermetallen auf die Selenkomponente des Enzyms muß untersucht werden. Silber, von dem bekannt ist, daß es im Tier die Glutathionperoxidase-Aktivität beeinflußt, soll zur Untersuchung der Wirkungen am Enzym auf molekularer Ebene dienen.

Dabei sollen mit dem sich als ausgleichender Inhibitor erweisenden Silber Bindungsstudien am Enzym mit dem radioaktiven Isotopen ^{110m}Ag durchgeführt werden. Für Experimente, die weitere Analysen nach der Silberbehandlung des Enzyms erforderlich machen, muß jedoch wegen der relativen Gefahr beim Arbeiten mit radioaktiven Isotopen eine andere Silbernachweis-Methode gefunden werden. Das Arbeiten mit einer ionensensitiven Elektrode erweist sich als zweckmäßig und mit deren Hilfe sollen Titrationen des Enzyms mit Silberionen durchgeführt werden. Diese Methode, die eine Ermittlung der Stoechiometrie der Reaktion ermöglicht, wird von begleitenden Nachweisen der enzymatischen Aktivität, des Selengehaltes und Versuchen zum molekularen Verhalten des

Proteins unterstützt.
Dazu werden die Methoden der Disk-Elektrophorese und der SDS-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen herangezogen. Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms soll je nach den Eigenarten und Störfaktoren der zu untersuchenden Proben mit einem der beiden zur Verfügung stehenden Tests erfolgen.
Ebenso muß aufgeklärt werden, welche chemische Form des Silbers für die Inhibition verantwortlich ist. Dafür sollen verschiedene Silberformen benutzt werden.
Es wird erwartet, daß sich aus diesen Untersuchungen Aussagen darüber ergeben:

1. wie Silber auf das Enzym Glutathionperoxidase wirkt und welche Vorgänge sich bei der Reaktion an dem Protein abspielen;
2. was mit der Selenkomponente bei der Inhibitionsreaktion mit Silberionen geschieht;
3. in welcher Form die Selenkomponente im Enzym möglicherweise vorliegt und welche Folgerungen sich für den Reaktionsablauf im Enzym daraus ergeben.

2. Geräte und Materialien

2.1. Geräte

Filterfluorimeter, Aminco, Colora, Lorch
Ag^{+}/S^{2-}-ionensensitive Elektrode Typ 94-16A, ORION, Colora, Lorch
701 A Ionenmeter von ORION, Colora, Lorch
Thermostaten und "Ultra"-Kryostat, Colora, Lorch
Tischrechner HP 97, Hewlett/Packard
Glove-box, Dialyse-Zellen, Eigenbau der Werkstatt des Physiologisch-chemischen Institutes
Eppendorf Tischzentrifugen Typ 3200 und 5412, "Eppendorf"-Pipetten, "Eppendorf"-Photometer, Netheler und Hinz, Hamburg
Biorad Elektrophorese-Apparatur Typ 220, Biorad, München
Oxford Pipette, Kontron, München
Hohlfaser-Dialyse-Patronen, Berghof GmbH, Tübingen
Spectronic 210 A Doppelstrahlphotometer, Bausch und Lomb, München
Gamma Counter, Packard Instruments, USA
Ultrazentrifuge, Beckman Instruments, München
Polarograph PO-4, Radiometer, Kopenhagen
Rotationsverdampfer, Büchi, Flawil, Schweiz
Peristaltische Pumpe, Flachgel-Elektrophorese-Apparatur, Stromversorgung, Desaga, Heidelberg
Whirlmix, Cenco, Breda, Niederlande
Fraktionssammler "Golden Retriever" und "Golden Retriever Pup", ISCO, Lincoln, USA
Präzisions-ph-Meter, Knick, Berlin
Einstab-Glaselektrode, Ingold, Frankfurt

2.2. Chemikalien und Hilfsmittel

2,3-Diamino-naphthalin, Guanidincarbonat, Fluka, Neu-Ulm
^{110m}Ag von Amersham Buchler, Braunschweig
Subtilisin, Selenocystin, Selenomethionin, Selenocystamin, Sigma, München
BSA 3x krist., MOPS (N-Morpholino-3-propansulfonsäure), Lactose, p.A., Dithioerythrit, Jodacetamid, Serva, Heidelberg
Sephadex G-25, G-150, Sephadex PD2-Säule, Pharmacia, Uppsala, Schweden
Silberselenid, ICN, USA
GSH, Pharma Waldhof, Aschaffenburg
Gluthationreduktase, NADPH, Böhringer, Mannheim
t-Butylhydroperoxid, Elektrochemische Werke, München

Zur Diskelektrophorese:
Acrylamid rein, N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, Ammoniumpersulfat, Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan, Glycin, Riboflavin, Coomassie Brilliant Blue R 250 und Natriumdodecylsulfat von Serva, Heidelberg

Alle weiteren Reagenzien waren Substanzen der Firma Merck, Darmstadt.

3. Methoden

3.1. Isolierung und Lagerung der GSH-Peroxidase

Die Isolierung des Enzyms erfolgte nach der bereits bekannten Methode[17] in einer leicht modifizierten Form. Die Lagerung des Enzyms erfolgte in lyophilisierter Form in Anlehnung an eine beschriebene Methode[165].

3.2. Proteinbestimmungen

Es wurden die Methoden von LOWRY et al.[147] und ZILLIG und HEIL[166] verwendet. Daneben wurde nach FLOHÉ et al.[10] durch Extinktionsmessung bei 280 nm (E_{280} = 1,0 ≙ 1,35 mg GSH-POD) die Proteinkonzentration von Lösungen hochgereinigter Glutathionperoxidase bestimmt.

3.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSH-Peroxidase

Wenn es die Materialmenge gestattete, wurde der sogenannte polarographische Test nach GÜNZLER und FLOHE[17] benutzt. In den meisten Fällen wurde jedoch der sogenannte gekoppelte Test nach GÜNZLER et al.[148] benutzt. Für die Berechnung der Aktivitäten ergibt sich folgende Berechnungsformel

$$U_{37} = 0{,}263 \times E_{366}/\text{min}$$

3.4. Selenbestimmungen

Ein Teil der Proben wurde nach Lyophilisation und Einschmelzen in Quarzröhren im KFZ Karlsruhe mit Neutronen bestrahlt

und von H.H. SCHOCK[1] nach der Methode der Neutronenaktivierungsanalyse ausgewertet.
Als schnellere und zugleich im Labor verfügbare Methode wurde die Analyse nach WATKINSON[149] in leicht variierter Form benutzt, die Selen (IV) mit 2,3 Diaminonaphthalin spektrofluorimetrisch nachweist. Zum Aufschluß der Proben wurde eine leicht modifizierte Form der Methode von TÖLG et al.[150] verwendet.

3.5. Diskontinuierliche Gelelektrophoresen

Die Enzymproben vor und nach Behandlung mit den entsprechenden Reagenzien wurden gegen den Sammelgelpuffer dialysiert. Dabei wurden die Proben (jeweils 100 µl) in Mini-Dialysezellen gegeben und 24 h in dem Puffer gerührt. Diese Prozedur wurde 2 mal wiederholt. Die Auftragmengen betrugen zwischen 8 und 50 µg Protein pro Probentasche. Es wurden Acrylamidgele nach MAURER[152], System 1a (Trenngel pH 8,9 und Sammelgel pH 6,7), hergestellt; die Gele sind 7 %ig an Acrylamid. Die Elektrophorese der 6 mm starken Gele wurde bei einem Strom von 50 mA durchgeführt. Bromphenolblau diente als Marker für die Front. Die Proteinbanden wurden mit 0,03 % Coomassie Brilliant Blue R 250 in Methanol/Eisessig/TCA/H_2O (20:6:5:69) angefärbt und fotografiert.

3.6. Kontinuierliche Gel-Elektrophoresen in Gegenwart von SDS

Die Enzymproben wurden wie vorangehend beschrieben ebenso gegen den Gelpuffer dialysiert und anschließend 3 min. mit 1 % SDS und 1 % Mercaptoäthanol bei 100° C inkubiert.
Als Elektrophoresesystem wurden die Bedingungen von WEBER und OSBORN[153] in einer Modifizierung nach BISSWANGER[154] benutzt. Das Gel war 10 %ig an Acrylamid, 0,08 M Na-Phosphat-

puffer pH 7,0 und 0,3 %ig an SDS.
Die Laufbedingungen waren: ein 1,5 mm dickes Gel, 80 mA Stromstärke und eine Laufdauer von 4 h.
Die Anfärbung erfolgte wie zuvor beschrieben mit Coomassie Brillant Blue und die Gele wurden ebenso fotografiert.

3.7. Silbernachweismethoden

Je nach Art der Probe und der Notwendigkeit, weitere Nachweismethoden oder Bestimmungen damit durchzuführen, wurde entweder die γ-Spektrometrie unter Verwendung des radioaktiven Isotops ^{110m}Ag oder der Nachweis mit Hilfe einer ionensensitiven Elektrode benutzt.

3.7.1. γ-Spektrometrie des ^{110m}Ag

Zunächst wurde mit der Methode der diskreten Kanalverschiebung ein γ-Spektrum aufgenommen. Die Multiplier-Hochspannung wurde auf ca. 540 V, die "Gain" (Verstärkung) auf 80 % eingestellt. Als Strahlungsquelle dienten ca. 0,1 μCi ^{110m}Ag als $AgNO_3$ im Proberöhrchen.
Zur Eichung wurden Silbermengen von 3,15 bis 125 ng Ag ($\triangleq$ 0,028 bis 1,15 nMol) von ^{110m}Ag mit einer spezifischen Aktivität von 1 mCi/0,63 mg ^{110m}Ag eingesetzt. Die jeweilige Radioaktivität, gemessen in counts/min., wurde jeweils für 2 verschiedene Meßkanäle registriert und für die Aufstellung einer Eichgerade verwendet.

3.7.2. Ag^+-Bestimmungen mit der Ag^+/S^{2-} ionensensitiven Elektrode

Zu den Messungen wurde eine Ag^+/S^{2-} ionensensitive Elektrode und eine mit einer Teflonschlauchbrücke verbundene "double-junction"-Referenzelektrode in ein 2 ml fassendes, auf 37° C thermostatisiertes Kunststoffgefäß eingetaucht.

Für die Anzeige stabiler Potentiale war eine höhere Fremdionenstärke nötig; ein 0,1 M Puffer erwies sich als ausreichend. Eine Eichkurve wurde erstellt, indem zu 2 ml 0,1 M MOPS-Puffer (pH 7,2) eine Titration in 1 µl Schritten über den Bereich von $5 \cdot 10^{-8}$ bis $2{,}95 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ (als $AgNO_3$) jeweils die Potentiale registriert wurden. Darauf wurde der Einfluß von Proteinen auf das Verhalten der Elektrode untersucht. Dazu wurde unter gleichen Bedingungen in dem Puffer $0{,}75 \cdot 10^{-5}$ M Rinderserumalbumin vorgelegt. Außerdem wurde Subtilisin als Protein eingesetzt. Für beide Proteine wurden bei jeweils verschiedenen Proteinkonzentrationen Titrationskurven aufgenommen. Mit Subtilisin wurde ebenso der Einfluß der Proteinkonzentration auf das Elektrodenverhalten bei konstanten Ag^+-Konzentrationen untersucht. Daneben wurde der Einfluß der verschiedenen Proteine vergleichend untersucht.

3.8. Inhibitionsversuch mit der GSH-Peroxidase

In einer Reihe von Versuchen wurden verschiedene Möglichkeiten der Inhibition des Enzyms untersucht. Dazu diente einerseits das Enzym γ-Glutamyltranspeptidase, andererseits kleinere Moleküle, wie hauptsächlich anorganische und organische Verbindungen. Ihre Wirkung wurde jeweils durch anschließende Tests der enzymatischen Aktivität der Glutathionperoxidase untersucht.

3.8.1. Versuche zur Inaktivierung mit γ-Glutamyltranspeptidase

Zu diesen Versuchen wurde zunächst das Enzym γ-Glutamyltranspeptidase aus Rattennieren angereichert. Anschließend wurde dieses Enzym mit der Glutathionperoxidase jeweils mit und ohne Hemmung der γ-Glutamyltranspeptidase inkubiert.

3.8.1.1. Anreicherung der γ-Glutamyltranspeptidase

Die Anreicherung erfolgte in Anlehnung an ORLOWSKI und MEISTER[167] mit Abwandlungen nach FLÜGGE[168], wobei jedoch bezüglich des Puffers eine Änderung erfolgte.
10 Rattennieren wurden in 80 mM $MgSO_4$ (pH 8,0) gepottert, der pH auf 8,2 eingestellt und in der Ultrazentrifuge bei 100 000g eine Stunde zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 1 % Na-Desoxycholat-Lösung über Nacht versetzt und wiederum eine halbe Stunde bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ammoniumsulfat-Fällung (bei 70 % $(NH_4)_2SO_4$) unterworfen und dann bei 12 000 g 30 min. zentrifugiert. Das an der Oberfläche schwimmende Protein wurde 24 h gegen 2 mM MOPS (pH 8,2) dialysiert. Das Dialysat wurde bei 18 000 g 30 min. zentrifugiert, und der Überstand enthielt dann das angereicherte Enzym. Die Isolierungsschritte wurden mit einem photometrischen Standardtest überwacht[151], wobei der Anteil an der Aktivität, der durch Serin/Borat hemmbar war, als -Glutamyltranspeptidase-Aktivität angesehen wurde.

3.8.1.2. Inaktivierungsansatz mit γ-Glutamyltranspeptidase

Es wurden 2 parallele Ansätze bei 37° C inkubiert und die enzymatische Aktivität der GSH-Peroxidase nach 20, 30, 40, 50 und 60 min. mit dem polarographischen Test bestimmt. Die Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

a) γ-GT-ungehemmt:

2 ml 0,2 M MOPS pH 8,2
500 µl angereicherte γ-GT
200 µl GSH-Peroxidase (2 U/ml (155 U/mg))
300 µl H_2O
200 µl 80 mM GlyGly
200 µl 2 % Triton X-100
300 µl 0,2 M $MgSO_4$

b) γ-GT-gehemmt:

2 ml 0,2 M MOPS pH 8,2
500 µl angereicherte γ-GT
200 µl GSH-Peroxidase (2 U/ml (155 U/mg))
300 µl 0,2 M Serin/Borat
200 µl 80 mM GlyGly
200 µl 2 % Triton X-100
300 µl 0,2 M $MgSO_4$

Aus diesen Ansätzen wurden jeweils 500 µl zum jeweiligen Zeitpunkt in den enzymatischen Test eingesetzt.

3.8.2. Inaktivierungsversuche mit Schwermetallen

Zur Überprüfung, ob die als Selenantagonisten bekannten Schwermetalle direkt mit der Glutathionperoxidase in Wechselwirkung treten, wurden die aussichtsreichsten Kandidaten auf eine Inhibitionswirkung hin untersucht. Dazu wurden je 50 µl einer Enzymlösung (10 U/ml (155U/mg) in 0,1 M KPP pH 7,0) mit 5 µl 4 mM GSH-Lösung für 10 min. inkubiert und anschließend mit 10 µl einer 5 mM Schwermetall-Lösung für 60 min. bei 37° C inkubiert. Die dabei eingesetzten 5 mM Lösungen wurden aus folgenden Salzen hergestellt: CdCl, $AgNO_3$, $TlNO_3$, $Pb(NO_3)_2$, $Hg\ SO_4$.
Die gesamte Ansatzlösung wurde dann direkt in den polarographischen Aktivitätstest überführt. Zur Kontrolle der Schwermetall-katalysierten Spontanoxidation von GSH wurden dabei Parallelansätze ohne Enzym mitgefahren.

3.8.3. Inaktivierungsversuche mit Halogenen und Halogeniden

Für die Aussage von Inhibitonsstudien mit organischen Halogenverbindungen, die relativ leicht zerfallen, ist es notwendig zu wissen, ob die möglichen Zerfallsprodukte, die freien Halogene und die Halogenide, nicht ebenso eine Hem-

mung des Enzyms bewirken können. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die Halogene J_2 und Br_2 sowie die Halogenide KJ und KBr eine Hemmung des Enzyms bewirken. Dabei sollte der Effekt des Substrates GSH auf diese Reaktion ebenso untersucht werden. Zunächst wurde eine Enzymlösung von 2 U/ml (155 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4 30 min. mit 0,4 mM GSH bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden je 550 µl dieser Lösung mit 50 µl einer 1 mM Lösung des Halogenids oder Halogens bei 37° C für 30 min. inkubiert. Danach wurden diese Ansätze mit dem polarographischen Test auf enzymatische Aktivität untersucht. In einem zweiten Versuch wurde ohne Vorinkubation mit GSH gearbeitet. Dazu wurden je 50 µl einer Glutathionperoxidase-Lösung (2 U/ml (155 U/mg)) zu je 50 µl einer 1 mM Lösung von Halogenid (J^- oder Br^-) und Halogen (J_2 oder Br_2) für 30 min. bei 37° C inkubiert. Die Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität wurden mit dem gekoppelten Test untersucht, wobei der Einfluß der Reagenzien auf das Testsystem durch Inkubation mit GSSG vergleichend untersucht wurde.

3.8.4. Weitere Inaktivierungsversuche

Neben Ag^+ sollten auch Au^+ und Cu^+ untersucht werden. Von beiden Spezies gibt es jedoch keine in wässriger Lösung stabilen Verbindungen, deswegen wurden AuCN und Cu_2O in fein verteilter Suspension eingesetzt. Dazu wurden jeweils 2 mg festes AuCN oder Cu_2O zu 100 µl Glutathionperoxidase-Lösung (2 U/ml (155 U/mg) in 1 mM MOPS pH 7,2) gegeben und unter Schütteln 60 min. bei 37° C inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit Hilfe des gekoppelten Tests kontrolliert.

3.9. Die Inhibition von GSH-Peroxidase durch Silber

In den nachfolgenden Experimenten werden die Bedingungen für die Silberhemmung der GSH-Peroxidase untersucht.

3.9.1. Die Silberhemmung in Abhängigkeit von der Enzymform

Hier sollte die Silberhemmung an der oxidierten Enzymform untersucht werden, da in den vorangegangenen Experimenten durch die Vorinkubation mit GSH immer die reduzierte Enzymform bei den Inhibitionsversuchen mit Silber vorlag. Dazu wurden 500 µl einer GSH-Peroxidase-Lösung (6 U/ml (176 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) mit 10 µl 0,25 mM H_2O_2 für 30 min. bei 37° C inkubiert. Nach einer Sephadex G-25 Säulenchromatographie wurde die enzymatische Aktivität mit dem polarographischen Test überprüft. Anschließend wurden zu 500 µl einer gleichen Enzymlösung nach der gleichermaßen erfolgten H_2O_2-Behandlung 50 µl einer 40 mM $AgNO_3$-Lösung zugesetzt, weitere 15 min. inkubiert und der Ansatz auf eine Sephadex G-25 Säule (12 x 140 mm) gegeben und mit 5 mM MOPS pH 7,4 eluiert.

3.9.2. Versuche zur Hemmung mit Ag^+ und Ag^0

Alle Arbeiten wurden unter N_2-Begasung in einer Glove-box durchgeführt. Als Ag^0 wurde sogenanntes molekulares Silber benutzt. Zunächst wurde das Enzym vorbereitet. 500 µl einer Glutathionperoxidaselösung (36 U/ml (376 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) wurden mit 20 µl 10 mM GSH-Lösung für 30 min. bei 37°C inkubiert. Dann wurden mit Hilfe einer Sephadex PD-2-Säule die niedermolekularen Bestandteile vom Protein abgetrennt. Nach einem Test der enzymatischen Aktivität und der Hemmbarkeit dieser Charge durch 10^{-5} M Ag^+ wurden je 50 µl der Glutathionperoxidase-Lösung mit folgenden Reagentien 60 min. bei 37° C inkubiert:

1. + 1 mg KBH_4 + 5 µl H_2O
2. + 1 mg KBH_4 + 2 mg Ag^o + 5 µl H_2O
3. + 5 µl H_2O
4. + 2 mg Ag^o + 5 µl H_2O
5. + 5 µl 10^{-4} M Ag^+

Anschließend wurden alle Ansätze auf enzymatische Aktivität mit Hilfe des gekoppelten Testes untersucht.

3.9.3. Zeitabhängigkeit der Silberhemmung

Für weitere Untersuchungen der Silberhemmung war es wichtig festzustellen, nach welcher Zeit die Reaktion beendet oder optimal abgelaufen ist. Dazu wurden 500 µl einer GSH-Peroxidaselösung (2 U/ml (205 U/mg) in 2 mM MOPS pH 7,4) mit 500 µl einer $6{,}5 \cdot 10^{-7}$ M Ag^+-Lösung versetzt. Nach 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 und 240 min. wurden jeweils Proben genommen und mit Hilfe des gekoppelten Testes auf enzymatische Aktivität untersucht.

3.9.4. Konzentrationsabhängigkeit der Silberhemmung

Ein weiterer Versuch diente zur Erstellung eines Inaktivierungsprofiles in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration. Dazu wurden je 20 µl einer GSH-Peroxidaselösung (40 U/ml (400 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) mit je 20 µl einer $AgNO_3$-Lösung mit jeweils verschiedener Ag^+-Konzentration für 15 min. bei 37° C inkubiert. Dann wurden aus jedem Ansatz jeweils 3 Proben genommen und mit Hilfe des gekoppelten Testes die Glutathionperoxidaseaktivität bestimmt.

3.9.5. Inhibitionsstudien mit $(AgCN)CN^-$

Für die Untersuchung, ob das Silber lediglich einen Redoxwechsel am Enzym verursacht, wurden Hemmversuche mit $(AgCN)CN^-$ unternommen. Während Ag^o/Ag^+ ein Standard-Redoxpotential von + 0,81 V hat, besitzt der Komplex $(AgCN)CN^-$ ein solches von - 0,31 V. In dem Versuch wurden 50 µl einer $2 \cdot 10^{-3}$ M CN^- und $8 \cdot 10^{-5}$ M Ag^+ enthaltenden Lösung 20 min. bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mit einem unbehandelten Ansatz die enzymatische Aktivität mit Hilfe des gekoppelten Testes verglichen.

3.9.6. Hemmversuche mit silberbeladenem Kieselgel

Neben der Wirkung von freien Ag^+-Ionen auf das Enzym sollte in diesem Versuch die Wirkung von trägerfixiertem AgCl auf das Enzym untersucht werden. Dazu mußte dieses Material hergestellt werden. Es wurde nach der Beschreibung von AIGNER et al.[156] Kieselgel mit Silberchlorid beladen. Das so gewonnene Material wurde für die nachfolgenden Versuche benutzt. Als Kieselgelmaterial diente Kieselgel HF von Merck, das in seiner unbehandelten Form zu Vergleichsmessungen benutzt wurde. Für die Inhibitionsstudien wurde je 1 ml einer GSH-Peroxidaselösung (16 U/ml (205 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) ohne Kieselgel, mit 40 mg Kieselgel HF und 40 mg Silberchlorid-beladenem Kieselgel für 30 min. bei 37° C inkubiert, dabei alle 5 min. aufgeschüttelt und schließlich zentrifugiert. In den Überständen wurde mit Hilfe des polarographischen Testes die enzymatische Aktivität und der Proteingehalt überprüft.

3.9.7. Silberhemmung der GSH-Peroxidase im Erythrocyten

In einem weiteren Versuch sollte die Ag^+-Wirkung auf frisch gewonnene Erythrocyten untersucht werden. Dazu wurden je 200 µl Humanblut mit 20 µl 0,1 M $AgNO_3$-Lösung oder 20 µl

0,9 % NaCl bei 37° C für 10 min. inkubiert. Darauf wurden die Erythrocyten abzentrifugiert, 2 mal mit 0,9 %iger NaCl und 1 mal mit 1 %iger KCN-Lösung gewaschen und anschließend mit H_2O bidest hämolysiert. Der Hämoglobingehalt der Hämolysate wurde auf 8,8 mg Hb/ml eingestellt und die GSH-Px-Aktivitäten der silberbehandelten Erythrocyten mit der der unbehandelten verglichen.

3.10. Reaktivierungsversuche der Silber-gehemmten GSH-Peroxidase

Für die Aussagen über die Wirkung des Silbers auf das Enzym ist es entscheidend, ob die Reaktion reversibel ist oder nicht und welche Agenzien möglicherweise reaktivierend wirken.

3.10.1. Reaktivierungsversuche mit GSH

Da die Wirkung des Silbers möglicherweise in einer Oxidation der Selenkomponente des Enzyms bestehen könnte, sollte geprüft werden, ob GSH als Reduktionsmittel diesen Vorgang wieder rückgängig machen kann. Dazu wurden 20 µl einer GSH-Peroxidase-Lösung (40 U/ml (376 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) mit 20 µl einer $1 \cdot 10^{-5}$ M $AgNO_3$-Lösung für 15 min. bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 3 mal je 10 µl in ein Gemisch aus 100 µl 10 mM GSH und 100 µl 0,25 M KPP pH 7,0 pipettiert und 60 min. bei 37° C inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit Hilfe des gekoppelten Testes bestimmt.

3.10.2. Reaktivierungsversuche mit UV-Licht

Da UV-Licht reduzierend auf Silberionen wirkt, sollte versucht werden, durch eine lichtinduzierte Reduktion des Silbers die Hemmung rückgängig zu machen. Dazu wurden 500 µl

GSH-Peroxidase-Lösung (2 U/ml (155 U/mg) in 2 mM MOPS pH 7,4) mit je 500 µl H_2O bidest und 500 µl $1 \cdot 10^{-7}$ M $AgNO_3$-Lösung inkubiert und mit UV-Licht von 280 nm bestrahlt. Nach jeweils 2, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 und 120 min. wurden Proben zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit Hilfe des gekoppelten Testes entnommen.

3.10.3. Reaktivierungsansätze mit kolloidalem Selen

Da einige Versuche darauf hinwiesen, daß die Silberwirkung die einer Eleminierung des Selens aus dem Protein ist, wurde versucht, eine so gehemmte Enzymcharge mit kolloidalem Selen zu reaktivieren. Dazu wurde kolloidales Selen nach der Vorschrift von SCANDURRA et al.[157] hergestellt. Zur Hemmung des Enzyms wurde das mit Silberchlorid beladene Kieselgel benutzt, da es eine schnelle Entfernung der Silberquelle gestattete. Das kolloidale Selen wurde auf eine mögliche Pseudoperoxidaseaktivität untersucht.
Zuerst erfolgte der Hemmversuch. Dabei wurden je 1,2 ml einer GSH-POD-Lösung (22 U/ml (280 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) mit je 1,5 mg Kieselgel HF oder 1,5 mg Silberchlorid-beladenem Kieselgel versetzt, für 2 min. bei 37° C inkubiert und die Restaktivität mit Hilfe des gekoppelten Testes gemessen. Dann wurden je 1 ml der Überstände, sowie 1 ml 5 mM MOPS pH 7,4 mit je 4 ml der kolloidalen Selenlösung versetzt und bei 37° C inkubiert. Nach je 5, 10, 20, 40 und 60 min. wurden Proben genommen und mit Hilfe des gekoppelten Testes auf enzymatische Aktivität untersucht.

3.11. Untersuchungen mit dem radioaktiven Isotop ^{110m}Ag

Die Möglichkeit, daß Silber bei der Inaktivierungsreaktion an das Enzym bindet, sollte mit Hilfe des radioaktiven Isotops ^{110m}Ag geklärt werden. Dabei sollte die Reaktion jeweils mit vorausgehender Behandlung mit Jodacetamid (zur

Blockierung freier SH-Gruppen, ohne Inaktivierung des Enzyms[17]) und ohne diese Behandlung durchgeführt werden.

3.11.1. ^{110m}Ag-Behandlung von reduzierter GSH-Peroxidase

3,2 nmol GSH-POD (330 U/mg) gelöst in 1 ml 5 mM MOPS pH 7,4 wurden mit 40 nmol GSH bei 37° C 30 min. inkubiert. Anschließend wurden 4 µmol Ag^+ (^{110m}Ag/Ag im Verhältnis 1:10) zugefügt und 10 min. reagieren gelassen. Der Ansatz wurde dann auf eine Sephadex G 25-Säule (10 x 1 cm) aufgetragen und mit 5 mM MOPS pH 7,4 eluiert. Der Auslauf wurde fraktioniert, bei 280 nm die Extinktion aufgezeichnet und jede Fraktion im γ-counter ausgemessen. Ebenso wurde die enzymatische Aktivität während des Versuchs getestet.

3.11.2. ^{110m}Ag und Jodacetamid behandelte GSH-Peroxidase

In einem zweiten Versuch wurden 3,6 nmol GSH-POD (330 U/mg) in 1 ml 5 mM MOPS pH 7,4 mit 40 nmol GSH für 30 min. bei 37° C inkubiert. Dann wurden 80 nmol Jodacetamid hinzugegeben und 30 min weiterinkubiert. Darauf erfolgte eine Zugabe von 4 µmol Ag^+ (^{110m}Ag/Ag im Verhältnis 1:10) und weitere 10 min. Inkubation. Der Ansatz wurde ebenso auf die Sephadex G 25-Säule gegeben, eluiert und die gleichen Parameter wie im ersten Versuch bestimmt.

3.12. Auswirkungen der Silberionen auf den Selengehalt der GSH-Peroxidase

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob Silber den Selengehalt des Enzyms beeinflußt. Für diese Versuche wurden wegen der erforderlichen Selenmengen für die Nachweismethode nur hochgereinigte Enzymchargen in mg-Mengen benötigt. Dabei stellten sich unerwarteter Weise Schwierig-

keiten ein, die bei geringeren Proteinmengen nie aufgetreten waren. So war die Inhibition nicht mehr vollständig, wenn das Enzym nicht vorher mit GSH behandelt und über eine Sephadex G-25-Säule von niedermolekularen Bestandteilen (Lactose, Mercaptoäthanol, GSH etc.) befreit worden war. Ebenso trat genau bei den Silbermengen, die eine Inhibition bewirkten, ein partieller Niederschlag von Protein auf. Deswegen konnte in den ersten Experimenten immer nur der noch im löslichen Überstand befindliche Proteinanteil berücksichtigt werden. In parallel laufenden Untersuchungen wurde versucht, den Niederschlag aufzulösen oder durch geeignete Lösungsmittel von vornherein zu verhindern.

3.12.1. Sephadex G-25-Chromatographie des silbergehemmten Enzyms

Mit Hilfe der Gelchromatographie auf Sephadex G-25 sollte versucht werden, niedermolekulare Bestandteile des Enzyms und des Reaktionsansatzes nach der Silberbehandlung vom Protein abzutrennen und so das jeweilige Verhältnis von Protein zu Selen in den entsprechenden Fraktionen in Abhängigkeit von der Silberwirkung zu bestimmen. Hierzu wurden verschiedene Ansätze und Behandlungsmethoden des Enzyms vor und nach der Silberbehandlung benutzt.
In einem ersten Versuch wurde das Enzym mit GSH vorbehandelt, auf Sephadex G-25 chromatographiert und anschließend analytisch untersucht. Der größte Anteil wurde dann lyophilisiert und anschließend reduziert, mit Jodacetamid und $AgNO_3$ behandelt. Eine Sephadex G-25 Chromatographie mit Analysen der Proteinfraktionen sollte dann folgen. Dazu wurden 1 ml GSH-POD-Lösung (1,05 mg POD (370 U/mg) gelöst in 1 ml 5 mM MOPS pH 7,5) mit 10 µl einer 4 mM GSH-Lösung 30 min. bei 37° C inkubiert. Dann wurden 10 µl für den polarographischen Test abgenommen und der Ansatz auf eine Sephadex G-25-Säule (0,9 x 28 cm) aufgetragen und in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Anschließend wurde in den entsprechenden Fraktionen durch Extinktionsmessung bei 280 nm Protein

bestimmt und je 100 µl der Selenanalytik mit Hilfe des fluorimetrischen Verfahrens zugeführt. Nun wurden die proteinhaltigen Fraktionen lyophilisiert und anschließend in 500 µl 5 mM MOPS pH 7,4 aufgelöst (Proteingehalt 0,614 mg POD/ml). Zu dieser Lösung wurden 5 µl 4 mM DTE-Lösung gegeben, 30 min. bei 37° C inkubiert, dann mit 5 µl 8 mM Jodacetamid-Lösung ebenfalls 30 min. bei 37° C inkubiert und 10 µl der Lösung für den polarographischen Test abgenommen. Dann erfolgte eine Zugabe von 10 µl einer 10 mM $AgNO_3$-Lösung, und es wurde 5 min. bei 37° C inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit Hilfe des polarographischen Tests bestimmt. Im Ansatz war eine leichte Trübung zu bemerken. Deswegen wurde zentrifugiert und der geringe Niederschlag verworfen. Der Überstand wurde wiederum auf die Sephadex-Säule aufgetragen und in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden bei 280 nm vermessen und jeweils 200 µl der Selenanalytik zugeführt.
In einem zweiten Versuch sollte ohne Fraktionierung des Proteins der Frage nach der Natur des entstehenden Niederschlags nachgegangen werden.
Dazu wurden 3 mg Lyophilisat der POD (370 U/mg) in 200 µl 5 mM MOPS pH 7,4 gelöst, mit 10 µl einer 4 mM GSH-Lösung bei 37° C für 30 min. inkubiert und auf einer Sephadex PD-2-Säule chromatographiert. Das Protein wurde in einem Volumen von 500 µl aufgefangen, der Proteingehalt bei 280 nm bestimmt und der Selengehalt in 2 x 20 µl überprüft. Zu den verbleibenden 460 µl wurden 10 µl einer 4 mM GSH-Lösung gegeben und 30 min. bei 37° C inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 10 µl 8 mM Jodacetamid und 30minütiger Inkubation bei 37° C wurde wiederum auf der Sephadex PD-2-Säule chromatographiert. In den aufgefangenen Volumina (500 µl) wurde die enzymatische Aktivität bestimmt, 50 µl 2 mM $AgNO_3$-Lösung zugegeben und 20 min. bei 37° C inkubiert. Es erfolgte eine Aktivitätsbestimmung. Nun wurde der gebildete Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand auf der Sephadex PD-2-Säule chromatographiert. Das Protein wurde wiederum in 500 µl aufgefangen, Extinktion bei 280 nm gemessen und

insgesamt 250 µl der Selenanalytik zugeführt. Der entstandene Niederschlag ließ sich in 200 µl einer $1 \cdot 10^{-2}$ M Cyanid-Lösung lösen. Die Lösung wurde ebenso auf der Sephadex PD-2-Säule chromatographiert und in 500 µl Volumen aufgefangen. Es folgte eine Protein- und Selenbestimmung.
In einem dritten Versuch sollte ohne GSH- und Jodacetamidbehandlung der Verlauf der Silberwirkung untersucht werden. Hierzu wurden 8 mg Lyophilisat der POD (355 U/mg) in 200 µl 0,1 M MOPS pH 7,2 gelöst, auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Das Protein wurde in einem Volumen von 1 ml aufgefangen, der Proteingehalt durch Messung bei 280 nm gemessen und der Selengehalt bestimmt. Die Aktivität des Enzyms wurde mit Hilfe des gekoppelten Tests bestimmt.
Der Ansatz wurde mit 0,1 M MOPS pH 7,2 auf 2 ml verdünnt und mit einer 10 nM $AgNO_3$-Lösung auf $1,6 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ gebracht. Dabei wurde mit dem gekoppelten Test die enzymatische Aktivität bestimmt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand auf der Sephadex G-25-Säule aufgetrennt. Das Protein wurde in einem Volumen von 1,4 ml aufgefangen und daraus sowohl Protein wie auch Selengehalt bestimmt.

3.12.2. Sephadex G-150-Chromatographie des silbergehemmten Enzyms

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Selengehalt und Protein nach der Silberbehandlung auch bei Variation der Chromatographie-Methode noch korrelieren. Dazu wurde 1 ml GSH-Peroxidaselösung (1,05 mg POD (425 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4) mit 10 µl 4 mM GSH 30 min. bei 37° C inkubiert. Dann wurde erst mit 10 µl 8 mM Jodacetamid für 30 min. und anschließend mit 10 µl 40 mM $AgNO_3$-Lösung für 10 min. bei 37° C inkubiert, wobei jeder Schritt durch einen Test auf enzymatische Aktivität überwacht wurde. Die entstandene Trübung wurde abzentrifugiert und der Überstand auf einer Sephadex G-25-Säule chromatographiert und anschließend lyo-

philisiert. Das Lyophilisat wurde in 1 ml 5 mM MOPS pH 7,4, 0,5 mM CN^- gelöst und Protein- sowie Selengehalt bestimmt. Dann wurde der Ansatz auf eine Sephadex G-150-Säule (1 x 100 cm) aufgetragen und mit 5 mM MOPS pH 7,4 eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden auf Protein- und Selengehalt untersucht.

3.13. Silberwirkung auf Selenoaminosäuren

Für mögliche Interpretationen der Silberhemmung des Enzyms sollte die Wirkung des Silbers auf Selenoaminosäuren untersucht werden. Als Modell-Substanzen dienten die Verbindungen Selenocystin, Selenomethionin und Selenocystamin. Selenomethionin und Selenocystamin wurden jeweils in 50 %iger Essigsäure aufgelöst, so daß eine Endkonzentration von 10 mM der jeweiligen Selenoaminosäure vorlag. Selenocystin ließ sich nicht vollständig in 50 %iger Essigsäure lösen; erst durch Zugabe von 10 µl HNO_3 conz auf 1 ml des Lösungsansatzes konnte eine 10 mM Lösung hergestellt werden. Alle 3 Lösungen wurden dann im Verhältnis 1:1 mit einer 10 mM $AgNO_3$-Lösung versetzt und 3 h stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine Dünnschicht-Chromatographie auf Polygram 300-Platten in Butanol/Eisessig/H_2O (4:1:1), wobei jeweils 1 µl aufgetragen wurde. Der Rest der Lösungen und Reaktionsansätze wurde über Nacht im Dunklen aufbewahrt. Ein Versuch, Selenocystin mit $NaBH_4$ zu Selenocystein zu reduzieren und dann mit Silber zu versetzen, mußte aufgegeben werden, da sofort eine Reduktion des Silbers erfolgte.

3.14. Titration der GSH-Peroxidase an der Ag^+-ionensensitiven Elektrode

Genaue und quantitative Aussagen über die Silberionenwirkung auf das Enzym Glutathionperoxidase lassen sich aus Titrationsexperimenten mit dem Inhibitor Silber ableiten. Dazu war es zunächst notwendig, Titrationen mit Modellverbindungen durchzuführen. Ebenso erwies es sich als wichtig, die möglichen Einflüsse auf den Titrationsverlauf zu untersuchen. Wichtigste Voraussetzung für einen quantitativen Verlauf war, daß das Protein während der Titration in Lösung blieb. Nach einer Reihe von Vorversuchen wurde gefunden, daß eine 3,85 M Lösung von Guanidinacetat diese Eigenschaften mit sich bringt. Dazu war es notwendig, das Reagenz selbst herzustellen.

3.14.1. Darstellung des Guanidinacetat

250 g Guanidincarbonat wurden mit Eisessig solange versetzt, bis eine visköse, leicht trübe Lösung entstand. Diese Lösung wurde am Rotationsverdampfer einrotiert und aus Äthanol umkristallisiert. Dann wurde noch zweimal aus Äthanol umkristallisiert. Die Kristalle wurden abgenutscht und mit Aceton und Äther vorsichtig gewaschen und bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Mutterlaugen wurden jeweils für weitere Ansätze benutzt.

3.14.2. Vergleichende Titration von GSH mit und ohne 3,85 M GuAc

Für die Festlegung des Äquivalenzpunktes einer Titration ist es unumgänglich, anhand von Modellsubstanzen das Verhalten der Elektrode gegenüber Einflüssen besonders der Änderung der Ionenstärke zu untersuchen. Die Titrationen wurden alle in einem thermostatisierten Gefäß bei 37° C durchgeführt. Als Puffer diente immer 0,1 M MOPS pH 7,2.

Für die erste Titration wurde $2,5 \cdot 10^{-5}$ M GSH in 0,1 M MOPS, pH 7,2, in einem Volumen von 2 ml vorgelegt und in 2 µl Schritten mit 10^{-3} M $AgNO_3$-Lösung und anschließend mit 10^{-2} M $AgNO_3$-Lösung titriert. Die angezeigten mV wurden jeweils nach 1 min. Einstellzeit registriert. Die zweite Titration wurde analog durchgeführt, wobei die $2,5 \cdot 10^{-5}$ M GSH Lösung in 0,1 M MOPS pH 7,2 noch 3,85 M an GuAc war. Auch hier wurden die angezeigten mV-Werte in eine Tabelle eingetragen.

3.14.3. Vergleichende Titration von Mercaptoäthanol

Der gleiche Versuch wurde mit Mercaptoäthanol durchgeführt. Im ersten Versuch wurden $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoäthanol in 2 ml 0,1 M MOPS pH 7,2 in 2 µl-Schritten titriert. In einem zweiten Versuch wurde ebenfalls $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoäthanol in 0,1 M MOPS pH 7,2, jedoch in Gegenwart von 3,85 M GuAc, mit $AgNO_3$ titriert.

3.14.4. Titrationsexperimente mit der GSH-Peroxidase in 3,85 M GuAc

Obwohl bereits Titrationen der GSH-Peroxidase in 0,1 M MOPS durchgeführt wurden, sollen diese nicht berücksichtigt werden, da eine Aussage für die Stöchiometrie der Reaktion wegen des Auftretens eines Niederschlages nur bedingt Gültigkeit besitzen würe. Deswegen wurden zunächst in einigen Versuchen die optimalen Bedingungen für eine Titration in 3,85 M GuAc gesucht, wobei die Selenanalytik weiterhin als Kontrolle für eine ordnungsgemäße Silberinhibition, neben dem enzymatischen Aktivitätstest, dienen sollte. In einem möglichst vollständigen Experiment sollte dann neben der vollständigen Titrationskurve der Verlauf der enzymatischen Aktivität aufgezeichnet werden und vor und nach der Titration die Selenkonzentration im Enzym bestimmt werden. Außerdem sollte mit Hilfe der Disk- und SDS-Elektrophorese eine

Veränderung des molekularen Verhaltens der Glutathionperoxidase durch die Silberhemmung untersucht werden. Die Auswertung der Titrationskurve soll dann eine stöchiometrische Auswertung der Silberinhibition ermöglichen.

3.14.4.1. Versuch der Titration in 3,85 M GuAc

In diesem Versuch sollte das erarbeitete Prinzip der Titration in 3,85 M GuAc zunächst erprobt werden. Dazu wurden 1 mg GSH-Peroxidase (355 U/mg) in lyophilisierter Form in 100 µl 0,1 M MOPS pH 7,2 gelöst, mit wenig (1 mg) $NaBH_4$ versetzt und nach 30 min. auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen. Die Äquilibrierung und Elution erfolgte mit 0,1 M MOPS pH 7,2. Das Eluat wurde auf Proteingehalt und Selenkonzentration untersucht. 0,5 ml von dieser Lösung wurden dann mit festem GuAc und 1,2 ml 3,85 M GuAc, 0,1 M MOPS pH 7,2 auf 2 ml verdünnt und in 2 µl Schritten von $1 \cdot 10^{-7}$ M bis $1 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ titriert. Von dem Titrationsansatz wurde dann 1 ml auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen. Äquilibrierung und Elution der Säule erfolgte durch 3,85 M GuAc, 0,1 M MOPS pH 7,2; dabei wurde gepumpt. Das proteinhaltige Eluat wurde auf Protein und Selengehalt untersucht.
Zu Vergleichszwecken wurde eine analoge Titration einer proteinfreien Lösung durchgeführt.

3.14.4.2. Titration bei erhöhter Proteinkonzentration

In einem weiteren Versuch sollte das Titrationsverhalten des Enzyms bei höheren Proteinkonzentrationen untersucht werden. Da für eine solche Titration höhere Silberkonzentrationen benötigt wurden, sollte zunächst deren Verhalten in dem verwendeten Lösungsmittelsystem erprobt werden. Dabei stellte sich heraus, daß bereits ab 10^{-3} M Ag^+ eine leichte optische Trübung (im Photometer zu beobachten) auftrat. Aus Sicherheitsgründen wurde deswegen auf Titrationsschritte

über 10^{-4} M Ag^+ hinaus verzichtet.
Für den Versuch wurden etwa 3 mg lyophilisierte GSH-Peroxidase (331 U/mg) in 200 µl 0,1 M MOPS pH 7,2 gelöst, für 30 min mit wenig $NaBH_4$ versetzt und auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen. Die eluierte Proteinfraktion (1,6 ml) wurde bei 280 nm vermessen und die enzymatische Aktivität bestimmt. Ein Teil wurde der Selenanalytik zugeführt. Aus einem Teil der Lösung wurde mit GuAc eine 3,85 M GuAc-Lösung hergestellt und dabei eine Enzymkonzentration von 0,81 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde nun von $1 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ titriert und die Potentiale notiert. 500 µl der titrierten Lösung wurden auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen und mit 3,85 M GuAc, 0,1 M MOPS pH 7,2 eluiert. Im Eluat wurde die Proteinkonzentration und der Selengehalt bestimmt. Zu Vergleichszwecken wurde eine zweite Titration der Elektrode ohne Protein durchgeführt.

3.14.4.3. Vollständige Titration mit Selenanalytik, Aktivitätskontrolle und Gelelektrophoresen der Glutathionperoxidase

In diesem Versuch sollte nun, nachdem die Bedingungen durch die vorausgegangenen Versuche festgelegt worden waren, eine vollständige Titration der Glutathionperoxidase erfolgen. Dabei sollte die enzymatische Aktivität während der Titration verfolgt werden. Außerdem sollte der Selengehalt vor und nach der Titration überwacht werden.
Für den Versuch wurde 1 mg lyophilisierte GSH-Peroxidase (312 U/mg) in 100 µl 0,1 M MOPS pH 7,2 gelöst und mit wenig $NaBH_4$ versetzt. Dann wurde die Lösung auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen und mit 0,1 M MOPS pH 7,2 eluiert. Die proteinhaltige Fraktion wurde auf Proteingehalt und Selenmenge untersucht. Die enzymatische Aktivität wurde bestimmt. Ein Teil der Lösung wurde mit GuAc versetzt und in 2 ml Ansatz (0,22 mg GSH-POD/ml) titriert. Die Titration erfolgte von $1 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ in 2 µl Schritten, dabei wurde jeweils das Potential notiert und jeder dritte

Schritt durch eine Probe für den enzymatischen Test überwacht. Nach Beendigung der Titration wurden 500 µl des Reaktionsansatzes auf eine Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) aufgetragen und mit 3,85 M GuAc, 0,1 M MOPS pH 7,2 eluiert. Die Proteinfraktion wurde bei 280 nm ausgemessen und Proben für die Selenanalytik genommen.
Sowohl von der Enzymcharge vor der Titration als auch von der nach der Titration wurden Proben abgenommen. Diese wurden gegen die jeweiligen Auftragpuffer dialysiert und einerseits einer Disk-Elektrophorese sowie andererseits einer SDS-Gelelektrophorese zugeführt.

3.14.4.4. Vollständige Titration für weitere Stöchiometrie-Berechnung

Zur nochmaligen Überprüfung der Stöchiometrie der Silberreaktion wurde ein weiterer Versuch durchgeführt.
Dazu wurden 2 mg lyophilisierte GSH-POD (351 U/mg) in 200 µl 0,1 M MOPS pH 7,2 gelöst und mit wenig $NaBH_4$ versetzt. Anschließend wurde die Lösung auf einer Sephadex G-25-Säule (0,5 x 20 cm) chromatographiert und das Protein in einer Fraktion eluiert. In dieser wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Dann wurde die Proteinkonzentration in einer 3,85 M GuAc, 0,1 M MOPS pH 7,2 Lösung so eingestellt, daß in dem Titrationsbereich sowohl eine totale Inhibition wie auch eine gut auswertbare Titrationskurve zu erwarten war. Dazu wurde eine Proteinkonzentration von 0,169 mg Enzym/ml in einem Volumen von 2 ml hergestellt. Die Titration erfolgte in 2 µl Schritten von $1 \cdot 10^{-6}$ M bis $1 \cdot 10^{-4}$ M, und die entsprechenden Potentiale wurden für weitere Auswertungen notiert.

4. Ergebnisse

4.1. Silbernachweismethoden

Für die Überprüfung der Bindung von Silber an das Enzym wurde mit dem radioaktiven Isotopen ^{110m}Ag gearbeitet. Der Nachweis dieses Isotops erfolgte mit γ-Spektrometrie. Für Titrationen mit anschließendem Selennachweis und Aktivitätskontrolle mußte eine Methode gefunden werden, die ein Arbeiten ohne radioaktive Isotopen ermöglichte und zugleich schnelleren Nachweis von Silberkonzentrationen ermöglichte. Hier erwies sich nach längeren Versuchen das Arbeiten mit einer ionensensitiven Elektrode als hinreichend.

4.1.1. γ-Spektrometrie des ^{110m}Ag-Isotops

Durch diskrete Ausmessung von schmalen Kanälen indem kleine aufeinanderfolgende Fenster des Diskriminators nacheinander ausgezählt wurden. In Abb. 4.1 ist ein so entstandenes γ-Spektrum einer 0,1 μCi ^{110m}Ag-Probe aufgezeichnet. Dabei wurden die Kanäle von 0 bis 1000 gegen die jeweilige Zählrate aufgetragen, ebenso ist die Nullrate eingetragen. Aus dem Spektrum wurden die Bereiche von 60 bis 360 als erstes Fenster und 60 bis 600 als zweites Fenster für weitere quantitative Messungen ausgewählt, wobei das erste Fenster den Diskriminatoren A-B und das zweite den von C-D zugeordnet wurde.
Der Vergleich der Zählausbeute für die Kanäle A-B und C-D ist in Abb. 4.2 dargestellt. Bei diesen Eichkurven ist jeweils eine bestimmte Aktivität gegen die entsprechende Impulszahl pro Minute aufgetragen. Wie deutlich ersichtlich ist, sind beide Kanäle mit guter Proportionalität für quantitative Messungen geeignet. Wegen der größeren Steilheit wurde jedoch Kanal A-B für die folgenden Versuche ausgewählt.
Eine weitere Eichkurve ist in Abb. 4.3 dargestellt. Sie ist durch Umrechnung der spezifischen Aktivität auf Gewichtseinheiten an Silber (ng -absolut-) oder stöchiome-

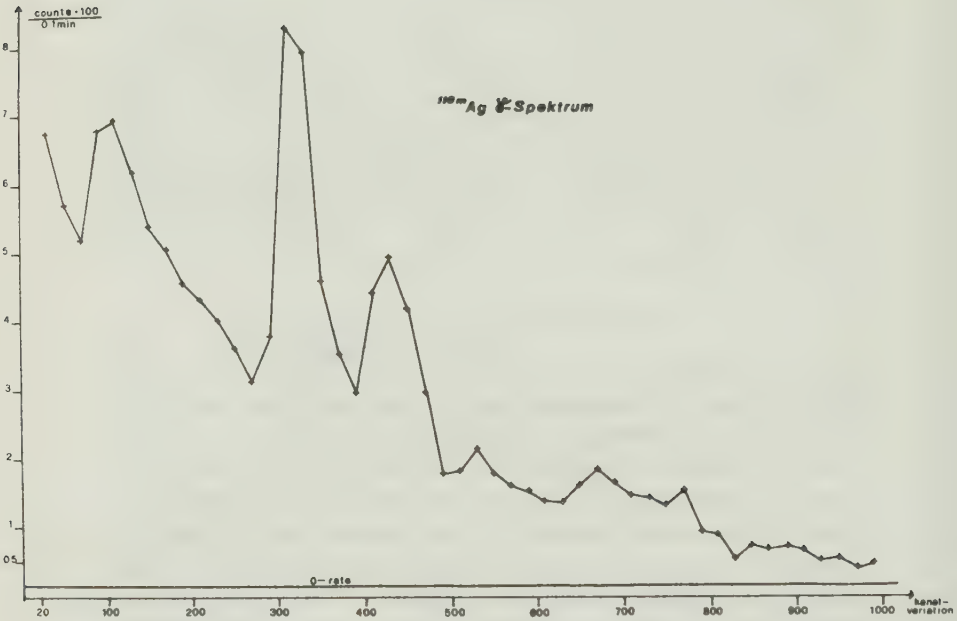


Abb. 4.1: γ-Spektrum einer 0,1 µCi ^{110m}Ag-Probe; gemessen durch Fensterverschiebung des Diskriminators. Bedingungen: Multiplier Hochspannung 540 V, Gain 80 %

trischen Einheiten (Mole) bezogen auf die entsprechenden Zählausbeuten gewonnen worden. Aus diesen Kurven ist ersichtlich, daß mit relativ guter Genauigkeit noch Mengen von $3 \cdot 10^{-11}$ Mol oder 3,3 ng Silber mit Hilfe dieser Methode nachgewiesen werden können. Außerdem wurde ein Proportionalitätskoeffizient von 4,69 $\frac{\text{pMol Ag}}{1000 \text{ counts}}$ oder 0,517 $\frac{\text{ng Ag}}{1000 \text{ counts}}$ ermittelt. Bedingt durch diese große

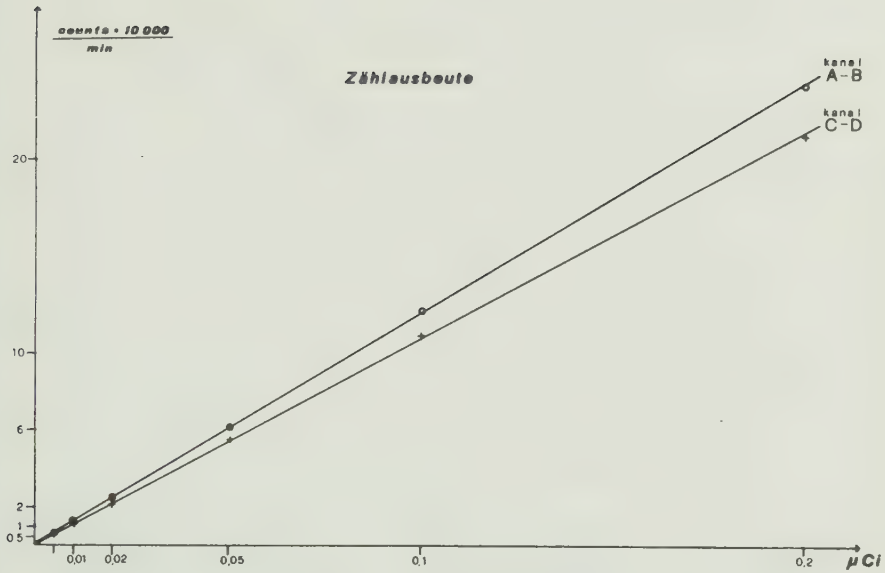


Abb. 4.2.: Vergleichende Zählausbeute zweier Kanalvariationen anhand von verschiedenen ^{110m}Ag-Konzentrationen; Spez. Aktivität: 1 mCi ≙ 0,63 mg Ag. Bedingungen wie bei Abb. 4.1.

Empfindlichkeit war es somit möglich, in den Experimenten mit Silberlösungen zu arbeiten, deren radioaktiver Silberanteil nur 1/10 der effektiven Silberkonzentration betrug.

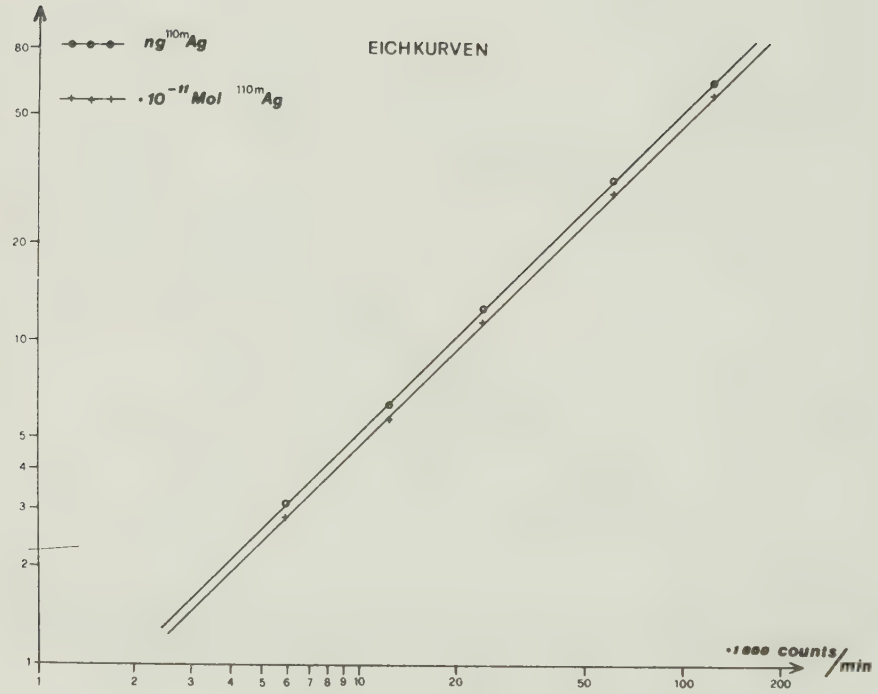


Abb. 4.3.: Eichkurven zur Silbermengenbestimmung (ng Ag oder Mol Ag) mit Hilfe von ^{110m}Ag durch Messung der counts/min; Spez. Aktivität 1 mCi ≙ 0,63 mg Ag, sonstige Bedingungen wie bei Abb. 4.1.

4.1.2. Ag^+-Bestimmung mit der ionensensitiven Elektrode

Bei ersten rein qualitativen Messungen fiel auf, daß das Anfangspotential der Elektrode stark von der Vorbehandlung abhing; d.h. in welchem Maße die Elektrode vorher poliert und gereinigt wurde und wie lange sie in verschieden konzentrierten Ag^+-Lösungen zur Äquilibrierung gestanden hatte. Deswegen wurde nach einer Behandlung mit einer 10^{-3} M Ag^+-Lösung die Elektrode über Nacht in 10 % KNO_3 belassen. Bei aufeinanderfolgenden Experimenten war dies jedoch nicht möglich. Deswegen mußte die Elektrode unter mehrfachem Wechsel eines 0,1 M MOPS pH 7,2 bis zum Stillstand des Potentials und thermostatisierter Umgebung etwa 1 h äquilibriert werden. Sulfhydrylgruppen enthaltende Lösungen mußten etwa zusätzlich 10 min vor Titrationsbeginn mit der Elektrode äquilibriert werden. Aus diesen Gründen wurde auf eine Messung des absoluten Elektrodenpotentials verzichtet und nur relative Spannungen gemessen, wobei der 0-Punkt willkürlich auf den Titrationsbeginn festgelegt wurde. Zudem wurde nach jeder Ag^+-Konzentrationsänderung 1 min vor dem Ablesen des Potentials gewartet; dieser Schritt war jedoch nur bei Lösungen unter $5 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ notwendig.

Eine quantitative Titration des Elektrodenpotentials ist in Abb. 4.4. dargestellt. Dabei wurden Ag^+-Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-8}$ bis $2{,}95 \cdot 10^{-4}$ M gegen die entsprechenden relativen Potentiale im halblogarithmischen Maßstab aufgetragen. Wie deutlich ersichtlich ist, beläuft sich der lineare Bereich der Elektrode von $2 \cdot 10^{-6}$ bis etwa $2 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+. Die bei niedrigeren Ag^+-Konzentrationen auftretende geringere Steilheit ist ein typisches Kennzeichen der meisten ionensensitiven Elektroden[158]. Daraus ergibt sich ein optimaler Bereich etwa von $1 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+, der für weitere Experimente eingehalten werden soll.

Der Einfluß von Proteinen auf die ionensensitive Ag^+/S^{2-}-Elektrode ist bekannt[159, 160]. Bedauerlicherweise hatten diese Autoren jedoch nur den Einfluß thiolhaltiger Proteine untersucht und führten den Effekt nur auf diese Gruppen in den Proteinen zurück. In dieser Arbeit konnte jedoch mit

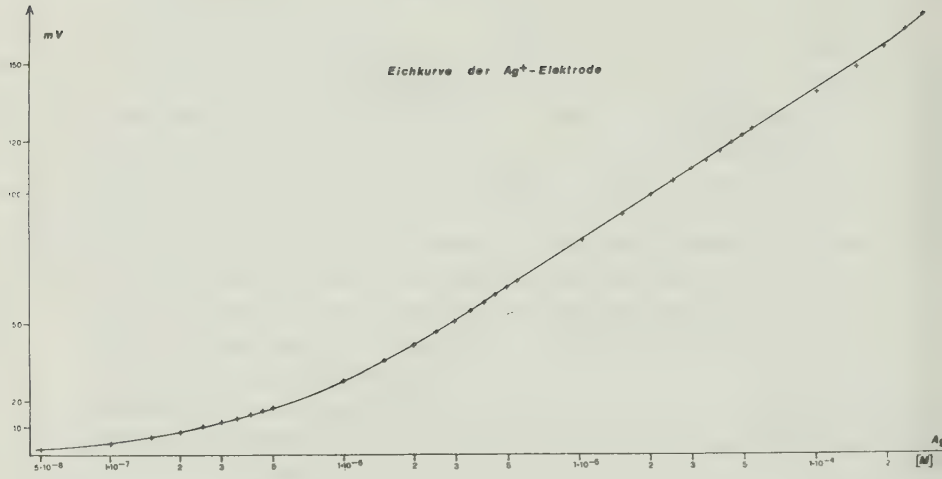


Abb. 4.4.: Eichkurve der Ag^+-Elektrode: Titration mit Ag^+-Lösungen. (Halblogarithmische Darstellung). Messung des relativen Elektrodenpotentials (in mV).
Bedingungen: Meßvolumen 2 ml, 0,1 M MOPS pH 7,2.

Hilfe des Proteins Subtilisin, das nachweislich keine Thiole enthält, nachgewiesen werden, daß dieser Effekt wohl mehr mit anderen Eigenschaften von Proteinlösungen zusammenhängt. Für diese Untersuchungen wurde zunächst eine Titration von $0{,}75 \cdot 10^{-5}$ M Rinderserumalbumin durchgeführt; sie ist in Abb. 4.5 dargestellt. Neben der Abweichung von der Linearität im Vergleich zur proteinfreien Lösung (vergl. Abb. 4.4.) sind ebenso bedeutend höhere Potentiale bei den entsprechenden Silberkonzentrationen zu beobachten.
Um den reinen Proteineffekt zu verfolgen, wurde nun bei verschiedenen Subtilisin-Konzentrationen eine Titration in dem Bereich von $4 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M Ag^+ durchgeführt.

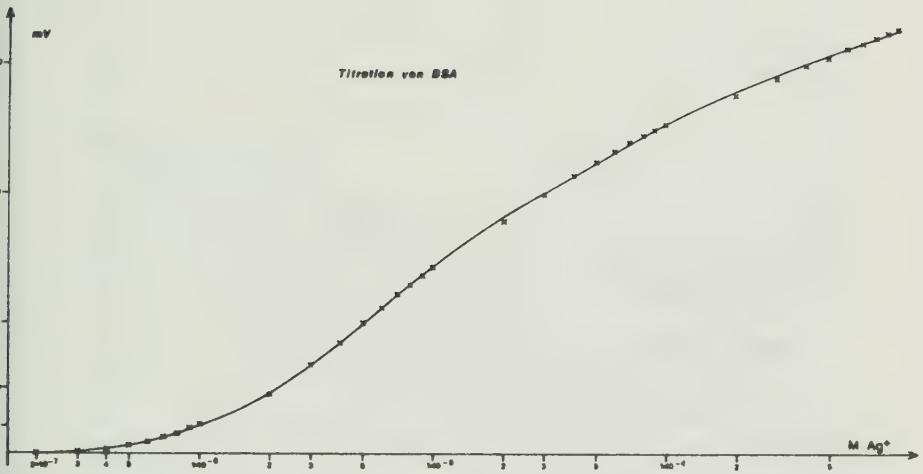


Abb. 4.5.: Titration von Rinderserumalbumin ($0{,}75 \cdot 10^{-5}$M) an der Ag^+-Elektrode mit verschiedenen Ag^+-Lösungen; Verlauf des relativen Potentials der Ag^+-Elektrode (halblogarithmische Darstellung); sonstige Bedingungen wie bei Abb. 4.4.

In Abb. 4.6. sind die Kurven in halblogarithmischer Darstellung wiedergegeben, wobei ein Titrationsansatz kein Protein enthielt. Eine Zuordnung von Protein-Konzentration mit den entsprechenden Potentialen bei jeweils konstanter Silberkonzentration ist in Abb. 4.7 dargestellt. Mit Hilfe eines Rechenprogrammes wurde auf einem Kleinrechner der jeweilige funktionelle Zusammenhang ermittelt,und die ermittelten Funktionen wurden mit den experimentellen Werten überprüft. Für eine grobe quantitative Näherung ergab sich für die Berechnung des Potentials einer bestimmten Silberkonzentration bei vorgegebener Proteinkonzentration (für

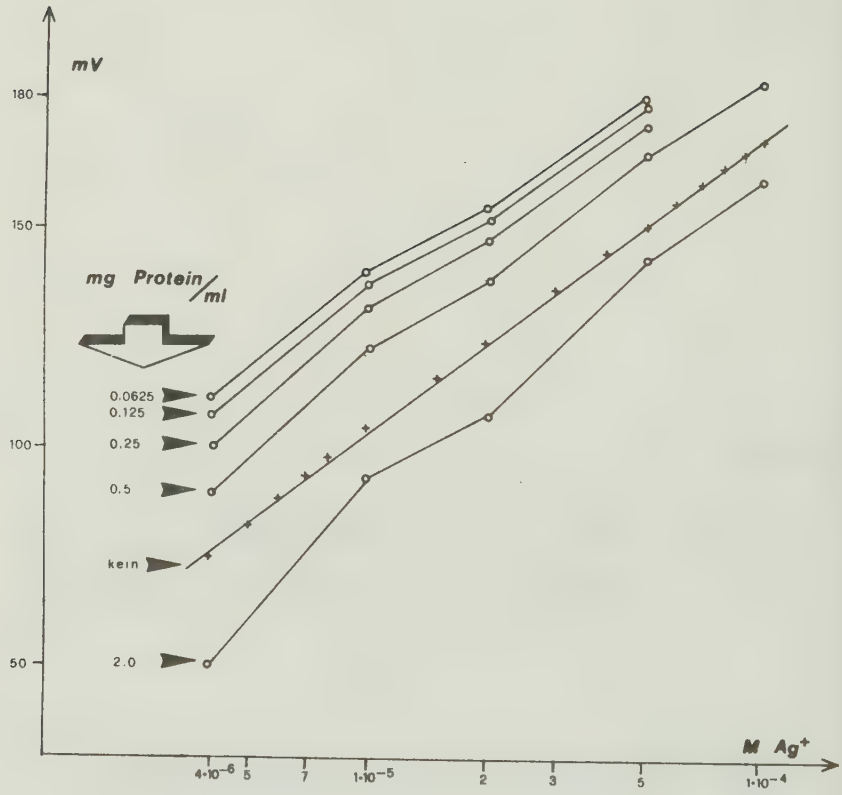


Abb. 4.6.: Veränderung des Elektrodenpotentials der Ag^+-Elektrode unter Einfluß eines SH-Gruppen-freien Proteins (Subtilisin): Variation der Proteinkonzentration; Titrationkurven bei jeweils einer bestimmten Proteinkonzentration mit Ag^+-Lösungen, ermittelt durch Messung des relativen Potentials der Ag^+-Elektrode (halblogarithmische Auftragung); sonst wie Abb. 4.4.

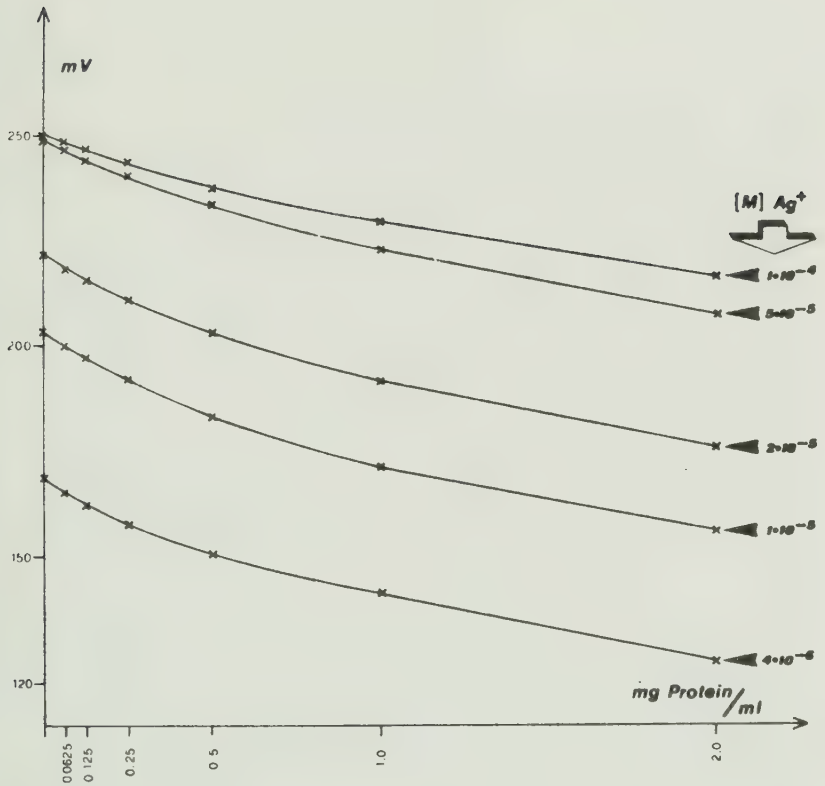


Abb. 4.7.: Abhängigkeit des Ag^+-Elektrodenpotentials von der Proteinkonzentration (Subtilisin). Je eine Kurve für eine Ag^+-Konzentration. Gleiche Bedingungen wie bei Abb. 4.6.

Subtilisin) folgende Funktion:

$$E = 500{,}73 + 28{,}56 \cdot P^{0{,}03} \cdot \ln \; Ag^{+}$$

wobei E in mV und P (die Proteinkonzentration) in mg/ml anzugeben ist.
Das unterschiedliche Verhalten der Ag^{+}/S^{2-}-Elektrode ohne und mit Protein stellt sich im nächsten Diagramm (Abb. 4.8.) dar. Dabei wurde jeweils 0,5 mg eines Proteins ohne SH-Funktion (Subtilisin) und eines Proteins mit SH-Gruppen (BSA) verglichen. Deutlich ist einerseits der von der SH-Funktion unabhängige reine Proteineinfluß und andererseits die bei SH-haltigen Proteinen vorhandene Abweichung von der Linearität im halblogarithmischen Diagramm zu erkennen. Außerdem verändern SH-haltige Proteine in einem größeren Bereich die Elektrodensteilheit.
Aus diesen Feststellungen läßt sich ableiten, daß die Abhängigkeit der Elektrode von Proteinen im allgemeinen nicht eindeutig einer einfachen Funktion zuzuordnen ist und somit von einer Berechnung der effektiven Silberionenkonzentration aus den abzulesenden Potentialen in Gegenwart von Proteinen abgesehen werden muß. Dagegen läßt diese Methode Äquivalenzpunktsermittlungen anhand des Verlaufs der Titrationskurve zu. Diese Möglichkeit sollte für die weitere Problemlösung ausgenützt werden, dabei soll hier darauf verwiesen werden, daß in allen dargestellten Titrationskurven unter der Ag^{+}-Konzentration immer die totale Silberionenkonzentration - unabhängig von der tatsächlichen freien Ag^{+}-Konzentration - zu verstehen ist.

4.2. Allgemeine Inhibitionsexperimente mit der Glutathionperoxidase

Als erstes lag eine Vorstellung zugrunde, bei der die aktive Selenkomponente über einen γ-Glutamylrest mit dem Protein verbunden sein könnte[20]. Daneben waren es mehr allge-

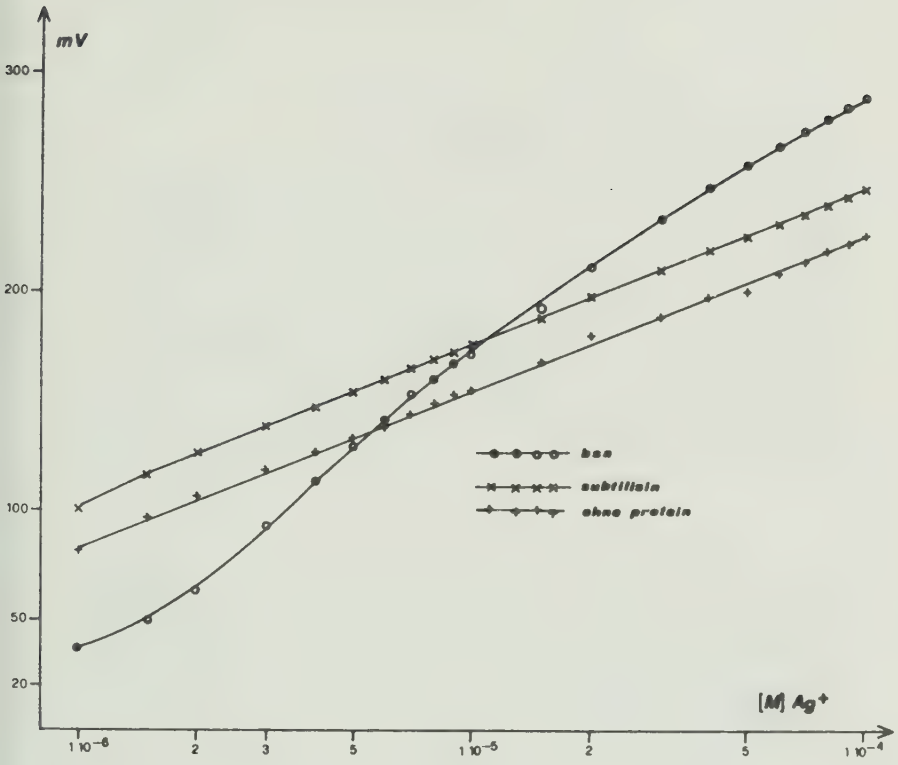


Abb. 4.8.: Verhalten des Ag^+-Elektrodenpotentials ohne, mit SH-freiem Protein (0,5 mg Subtilisin) und mit SH-haltigem Protein (0,5 mg BSA) in 2 ml Titrationsvorlage. Titration mit mehreren Ag^+-Lösungen (halblogarithmische Darstellung); Puffer: 0,1 M MOPS pH 7,2.

meinere Vorstellungen, für die gewisse Analogien zu bekannten Schwefelfunktionen in Proteinen Modell standen. Dabei wurde von den mit Schwefelfunktionen in Wechselwirkung tretenden Schwermetallen und anderen Stoffen Gebrauch gemacht.

4.2.1. Inaktivierungsversuche mit der γ-Glutamyltranspeptidase

Die Inkubation von GSH-Peroxidase mit γ-Glutamyltranspeptidase ergibt einen in Abb. 4.9. dargestellten Verlauf. Sowohl unter Inhibition der γ-Glutamyltranspeptidase als auch ohne Inhibition erfolgte mit ähnlicher Kinetik eine Abnahme der GSH-Peroxidase-Aktivität. Ein Abfall auf 84 % der Anfangsaktivität der GSH-POD nach 60 min Inkubation deutet jedoch eher auf einen Angriff allgemeinerer Art - z.B. Proteolyse durch mitgeführte Proteasen - als auf einen spezifischen Angriff auf das aktive Zentrum des Enzyms hin.

4.2.2. Schwermetallinaktivierungsversuch

Da weder Cl^-, NO_3^- oder SO_4^{2-} in 1 mM Konzentrationen eine Hemmung der GSH-Peroxidase bewirkten, sollen die Ergebnisse nur anhand der Kationen diskutiert werden. Nach Inkubation mit den entsprechenden Kationen war durch Überprüfung der enzymatischen Aktivität der GSH-POD nur bei

Ag^+ eine totale Hemmung

zu beobachten. Dagegen zeigten die Kationen

Cd^{2+}, Tl^{3+}, Pb^{2+}, Hg^{2+} keinen Hemmeffekt.

Die Hemmwirkung des Ag^+ war so ausgeprägt, daß sie weiter untersucht werden sollte.

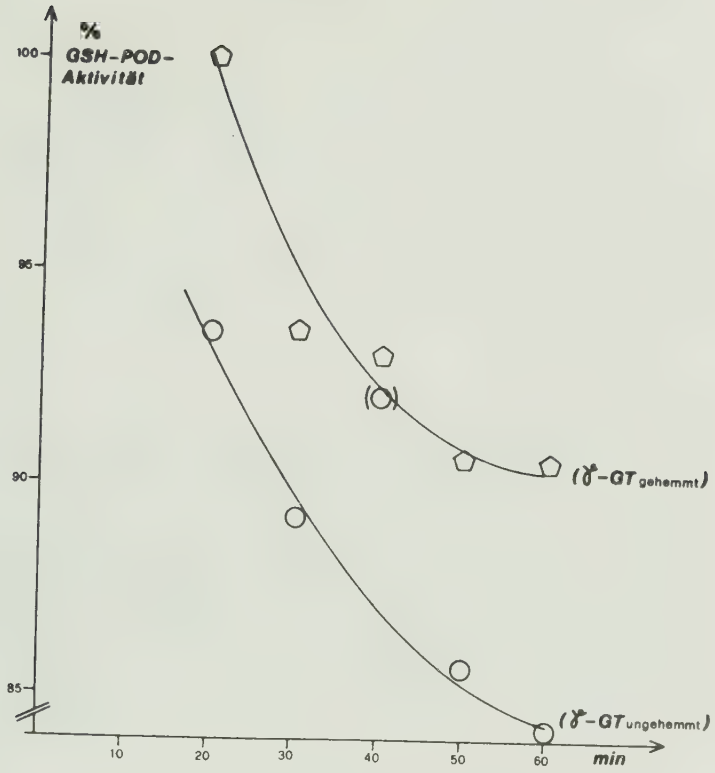


Abb. 4.9.: Inkubation von GSH-Peroxidase mit γ-Glutamyltranspeptidase: Zeitabhängigkeit der GSH-Peroxidase-Aktivitäts-Abnahme mit und ohne Hemmung der γ-Glutamyltranspeptidase; Test: polarographisch, je 500 µl aus Inhibitionsansatz. Inhibitionsansätze: siehe 3.8.1.2.

4.2.3. Inaktivierungsversuche mit Halogenen und Halogeniden

Wenn das Enzym mit GSH vorbehandelt worden war, konnte mit keinem der benutzten Reagentien eine Inhibition beobachtet werden. Dagegen zeigte sich bei unbehandeltem Enzym eindeutig eine Hemmung des Enzyms durch J_2 und Br_2, die durch die Anwesenheit von GSH im Ansatz verhindert werden konnte. Bei den verwendeten Konzentrationen (0,5 mM) von J_2 und Br_2 konnte bei Abwesenheit und ohne Vorbehandlung mit GSH mit Hilfe des gekoppelten Testes keine enzymatische Aktivität mehr nachgewiesen werden. Bromid und Jodid zeigten unter gleichen Bedingungen keine Wirkung auf die Aktivität des unbehandelten Enzyms.

4.2.4. Weitere Inhibitionsstudien

Die rein qualitativ angelegte Studie mit den Festkörpern AuCN und Cu_2O ergab Hemmungen des Enzyms. So konnten im Überstand des mit AuCN behandelten Enzyms nur noch 55 % der Aktivität und bei Cu_2O nur noch 69 % der Aktivität mit Hilfe des gekoppelten Testes nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch ein bei Reaktionen mit festen Stoffen auftretender Adsorbtionseffekt von Proteinen an Feststoffen nicht berücksichtigt.

4.3. Inhibition von GSH-Peroxidase durch Silber

Nachdem sich in ersten Vorversuchen Silber als effektiver Inhibitor erwiesen hatte, sollten die folgenden Experimente Aufschluß darüber geben, inwieweit die Enzymform, die Inhibitorform und die kinetischen Bedingungen auf die Inhibitionsreaktion einen Einfluß haben.

4.3.1. Silberhemmung und Enzymform

Nach dem heutigen Stand der Kenntnis[16, 17, 36] ist anzunehmen, daß es eine reduzierte und oxidierte Enzymspezies des Enzyms Glutathionperoxidase je nach den äußeren Bedingungen gibt. Außerdem lassen sich die bereits bekannten Inhibitoren jeweils im Angriffsziel (oxidierte oder reduzierte Enzymspezies) unterscheiden. Da in dem allgemeinen Experiment zur Inhibition mit Schwermetallen bereits nachgewiesen worden war, daß die GSH-reduzierte Spezies der GSH-POD durch Silber hemmbar ist, sollte hier eine Hemmung des oxidierten Enzyms versucht werden. Während eine enzymatische Aktivität der Enzymlösung vor Beginn des Experiments und nach H_2O_2-Behandlung nachgewiesen werden konnte, war nach $AgNO_3$-Behandlung keine Aktivität mehr meßbar. Um eine eventuelle Störung des Testes durch im Ansatz vorhandenes Ag^+ und/oder H_2O_2 auszuschließen, fanden Gelchromatographien des Proteins statt. Dabei wurden die 4 proteinhaltigen Fraktionen (je 500 µl) total in den polarographischen Testansatz eingesetzt und 2 min Reaktionszeit eingehalten. Bei den Ag^+-behandelten Fraktionen konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich, daß Silber ein von der vorliegenden Enzymspezies unabhängiger Inhibitor ist. Aus diesem Grund können in den nachfolgenden Experimenten je nach Fragestellung beide Enzymspezies vor der Silberhemmung eingesetzt werden.

4.3.2. Hemmung durch Ag^+ und/oder Ag^o

Diese Problemstellung erwies sich in der Bearbeitung als relativ schwierig, da bekannt ist, daß Silber auch im metallischen Zustand ständig von einer geringen Oxidschicht bedeckt ist, die in wässrigen Lösungen Ag^+ abgibt. Deswegen wurden neben dem reinen Oxidationsschutz (Glove-box, N_2-Begasung) auch Experimente mit starken Reduktionsbedingungen (KBH_4) durchgeführt. In der folgenden Tabelle sollen die Ergebnisse der Experimente zusammengefaßt werden:

	1	2	3	4	5
Hemmansatz	KBH_4+H_2O	KBH_4+Ag^o	H_2O	Ag^o+H_2O	Ag^+
Hemmwirkung	keine	keine	keine	total	total

Daraus kann ersehen werden, daß die geringen Ag^+-Mengen, die ohne stark reduzierende Bedingungen von molekularem Silber freigesetzt werden, ausreichen, um das Enzym zu hemmen. Daß Ag^o als solches nicht die Silberspezies ist, die eine Hemmung bewirkt, ist eindeutig aus dem Ansatz 2 zu ersehen. Damit ist für weitere Untersuchungen zu beachten, daß Ag^+ möglicherweise dasjenige Reagenz ist, das für die Hemmwirkung des Silbers verantwortlich ist.

4.3.3. Zeitabhängigkeit der Ag^+-Hemmung

Durch Vergleichsmessungen der enzymatischen Aktivität von unbehandelten und mit Ag^+-versetzten Enzymlösungen ließ sich folgendes feststellen: Bereits nach 5 min ist das Enzym durch Ag^+ total gehemmt, danach nimmt bis zu einer Zeit von 240 min die Aktivität nicht mehr zu. Daraus folgt, daß die Hemmung der GSH-Peroxidase durch Ag^+-Ionen ein sehr schneller und mit einfachen analytischen Nachweismethoden kinetisch nicht auflösbarer Vorgang ist.

4.3.4. Ag^+-Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung

Eine Glutathionperoxidase-Lösung von bekannter Aktivität wurde mit 7 verschiedenen Konzentrationen an Ag^+ ($1 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-4}$ M) jeweils in Einzelansätzen inkubiert und dann je 3 Proben nach Verdünnung im gekoppelten Test gemessen. Das Aktivitätsprofil in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration ist in Abb. 4.10 dargestellt. Es zeigt deutlich, daß die Hemmung der vorgegebenen Enzymaktivität bis zu etwa $2 \cdot 10^{-6}$ M Ag^+ nur gering gehemmt wird, dann aber ein starker Anstieg der Inhibition zu höheren Ag^+-Konzentrationen zu

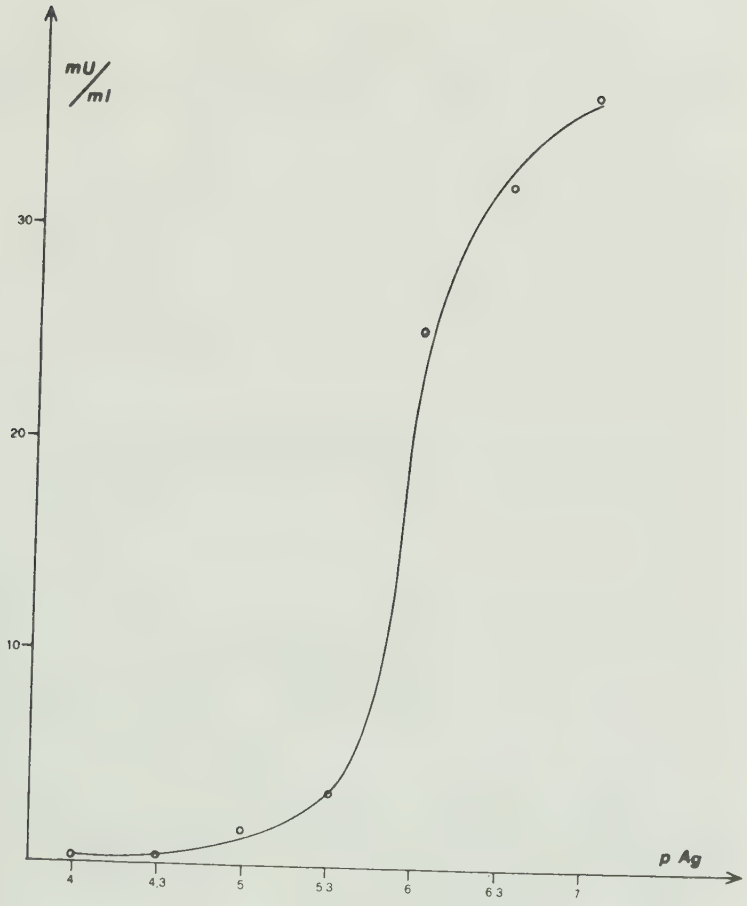


Abb. 4.10.: Aktivitätsprofil der GSH-Peroxidase: Abhängigkeit der GSH-Peroxidase-Aktivität von der Ag^+-Konzentration.
Ansatz: je 20 µl GSH-POD-Lösung (40 U/ml; 400 U/mg) in 5 mM MOPS pH 7,4 + 20 µl $AgNO_3$-Lösung.
Test: je Meßpunkt 3 Proben; gekoppelter Test

beobachten ist. Ab etwa $5 \cdot 10^{-6}$ M Ag^+ findet nur noch eine unwesentliche Abnahme der Aktivität statt.

4.3.5. Inhibition mit $(AgCN)CN^-$

Die Inhibition durch Ag^+-Ionen kann auch auf einer reinen Oxidation einer essentiellen Gruppe des Enzyms beruhen. Zur Untersuchung dieser Frage wurde mit dem Komplex $(AgCN)CN^-$ eine Inhibitionsstudie unternommen. $Ag^0/(AgCN)CN^-$ hat im Gegensatz zu Ag^0/Ag^+ (+ 0,81 V) ein Redoxpotential von - 0,31 V unter Standardbedingungen, damit besitzt dieses Agens eher reduzierende Eigenschaften.
Der Reaktionsansatz mit $(AgCN)CN^-$ zeigte im Vergleich zu unbehandeltem Enzym nach 20 min Inkubation nur noch 19 % der Aktivität. Damit ist nachgewiesen, daß ebenso der $(AgCN)CN^-$-Komplex zur Inhibition fähig ist und wegen des im Vergleich zu Ag^+ umgekehrten Redoxverhaltens des $(AgCN)CN^-$-Komplexes dürfte es sich bei dieser Inhibitionsreaktion nicht um einen Oxidationsvorgang am Enzym handeln.

4.3.6. Hemmungen mit silberbeladenem Kieselgel

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben mit Kieselgel HF, silberbeladenem Kieselgel sowie ohne Zusätze untersucht.
Ein Aliquot (50 µl) wurde vom Überstand abgenommen und mit Hilfe des polarographischen Testes die enzymatische Aktivität überprüft. Außerdem wurde von den entsprechenden Lösungen der Proteingehalt bestimmt. Alle Daten sind in der folgenden Tabelle enthalten.

	ohne Zusatz	40 mg Kieselgel	40 mg Ag-Kieselgel
Volumenaktivität [U/ml]	15,8	7,92	1,56
Protein-konzentration [mg/ml]	0,077	0,031	0,029
Spezifische Aktivität	205	255	53

Aus der Tabelle ist eine eindeutige Hemmung des Enzyms durch das silberbehandelte Kieselgel zu entnehmen. Daraus geht hervor, daß ebenso Silberchlorid als Ag^+-Quelle noch fähig ist, das Enzym zu hemmen.

4.3.7. Ag^+-Hemmung der GSH-Peroxidase im Erythrocyten

Da eine Hemmung des isolierten Enzyms nachgewiesen worden ist, sollte nun noch einmal zur Ergänzung der *in vivo* Beobachtungen ein direkter Einfluß von Ag^+ auf das Enzym im Erythrocyten nachgewiesen werden. Nach der beschriebenen Behandlung der Erythrocyten wurde in den entsprechenden Hämolysaten ein Aktivitätsvergleich der Glutathionperoxidase durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß durch die Ag^+-Behandlung nur noch 25 % der ursprünglich vorhandenen Glutathionperoxidase nachgewiesen werden konnten. Damit ist gleichzeitig auch ein Hinweis darauf gegeben, wie die Abnahme der GSH-Peroxidaseaktivität bei Silberbehandlung *in vivo* verlaufen kann.

4.4. Reaktivierungsversuche der Ag^+ gehemmten GSH-Peroxidase

Die Wirkung eines Inhibitors wird am besten durch die Untersuchungen zur Aufhebung der Inhibition aufgeklärt. In den meisten Fällen von Enzyminhibition wird versucht, mit Hilfe

der Substrate eine Reversibilität der Inhibition zu erreichen.

4.4.1. Reaktivierungsversuche mit GSH

Da GSH normalerweise einen Redox-Wechsel des enzymgebundenen Selens bewirkt[16], sollte untersucht werden, ob dieses Reagenz auch die Silberinhibition aufhebt, die möglicherweise auf einer Oxidation dieser Enzymkomponente beruht. Eine Messung der Enzymaktivität nach der Ag^+-Hemmung erbrachte den Nachweis, daß auch nach 60 min Inkubation mit einem Überschuß an GSH (20000-fach!) keine Reaktivierung des total gehemmten Enzyms zu erreichen ist.

4.4.2. Reaktivierungsversuche mit UV-Licht

Der Versuch, proteingebundenes Silber durch UV-Licht mit der Wellenlänge 280 nm vom Protein wegzureduzieren und dadurch das Enzym wieder zu reaktivieren, gelang nicht. Während der gesamten Zeit (2 bis 120 min) fand im Vergleich mit einer ungehemmten Enzymprobe keine Veränderung im Aktivitätsverhalten der Proben statt.

4.4.3. Reaktivierung mit colloidalem Selen

Eine andere Überlegung ging von der Möglichkeit aus, daß die Wirkung des Silbers auf einer Eliminierung des Selens aus dem Enzym beruht. So konnte eine Reaktivierung nur Erfolg haben, wenn fehlendes Selen wieder ersetzt würde, z.B. durch Angebot mit einer entsprechenden Selenquelle. Das Arbeiten mit colloidalem Selen stellt eine erprobte Möglichkeit dar[161]. Jedoch soll hier darauf hingewiesen werden, daß solche Experimente nur rein qualitative Untersuchungen erlauben, da das Material (das colloidale Selen) äußerst heterogen zusammengesetzt ist. Obwohl in solchen Anlagerungsverbindungen die verschiedensten Selenspezies vorkommen, zeigte das Material keine nennenswerte Glutathionper-

oxidaseaktivität. Da keine absolut quantitative Auswertung der Experimente vorgesehen war, fand die Hemmung vorher mit dem silberbeladenen Kieselgel statt, um die freie Ag^+-Ionenkonzentration klein zu halten. Die Reaktivierung mit dem colloidalen Selen zeigte nach 5 min keine weitere Steigerung. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse - mit den Meßwerten - dargestellt:

Probe	A	B	C
Enzymlösung	1,2 ml	1,2 ml	H_2O
Inhibition durch	+ Kieselgel	+ Ag-Kieselgel	-
Restaktivität [U/ml]	11,1	2,83	-
Reaktivierung mit colloidalem Selen ergab [U/ml]	11,1	6,36	0,69

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, konnte durch colloidales Selen keine Steigerung der Aktivität einer ungehemmten Enzymprobe erfolgen. Jedoch brachte die Behandlung von Ag^+-gehemmtem Enzym mit colloidalem Selen eine Reaktivierung von 25,5 % auf 50,8 % oder eine Steigerung der Restaktivität auf das 2-fache.

4.5. Untersuchungen mit ^{110m}Ag

Zur Feststellung, ob die Inhibition des Enzyms von einer Bindung des Silbers an das Enzym begleitet wird, sollte mit Hilfe des radioaktiven Isotops ^{110m}Ag eine solche Bindung durch Cochromatographie dieses Isotops mit der entsprechenden Proteinfraktion bei der Gelchromatographie auf Sephadex G-25 nachgewiesen werden. Da das Enzym ebenso SH-Gruppen enthält, die möglicherweise nicht an der Katalyse beteiligt

sind, sollte mit dem Reagenz Jodacetamid, das das Enzym nicht hemmt, eine Bindung von Silber an diese Gruppen vermieden werden. Deswegen wurde ein Versuch mit und einer ohne Jodacetamid-Vorbehandlung unternommen.

4.5.1. ^{110m}Ag-Behandlung von reduzierter GSH-Peroxidase

Der Verlauf der Sephadex G-25-Chromatographie ist in Abb. 4.11. dargestellt. Dabei ist der erste Peak jeweils die Proteinfraktion, die einen Teil des Silbers gebunden enthält. Der zweite Anstieg stellt die Front der niedermolekularen Bestandteile des Inkubationsansatzes dar und enthält unter anderem auch den Hauptanteil des nichtgebundenen, im Überschuß vorhandenen anorganischen Silbers. Zur Abschätzung des gebundenen Silbers pro Enzymmolekül wurde aus der Absorption bei 280 nm der Proteinanteil der gesamten Proteinfraktion (Fraktion 5, 6, 7 und 8) zu 0,033 mg berechnet. Je nachdem, ob man die Fraktion 8 hinzuzählt oder nicht, kommt man auf einen Silbergehalt dieser Fraktionen von 3,61 nMol oder 2,81 nMol Ag. Das ergibt bei Umrechnung einen Wert von §,2 resp. 7,2 Silberatome pro Molekül GSH-Peroxidase. Diese Werte sollen jedoch nur als Orientierungshilfe dienen, da die Meßwerte,insbesondere die Proteinbestimmung,mit relativ großen Fehlern behaftet sind.

4.5.2. Jodacetamid- und nachfolgende ^{110m}Ag-Behandlung

Wiederum ist der Verlauf der Sephadex G-25-Chromatographie in einem Diagramm - Abb. 4.12. - dargestellt. Im Gegensatz zu dem nicht mit Jodacetamid behandelten Enzym fällt auf, daß mit der Proteinfraktion nur sehr geringe Mengen von ^{110m}Ag cochromatographieren. Daraus folgt der Schluß, daß Jodacetamid-Behandlung zwar keine Hemmung des Enzyms bewirkt, aber es so verändert, daß, obwohl keine Silberbindung mehr nachzuweisen war, immer noch eine Silberhemmung mit dem Enzym zu erreichen ist; d.h. die Hemmung des Enzyms durch Silber muß auf eine Art erfolgen, bei der eine irreversible

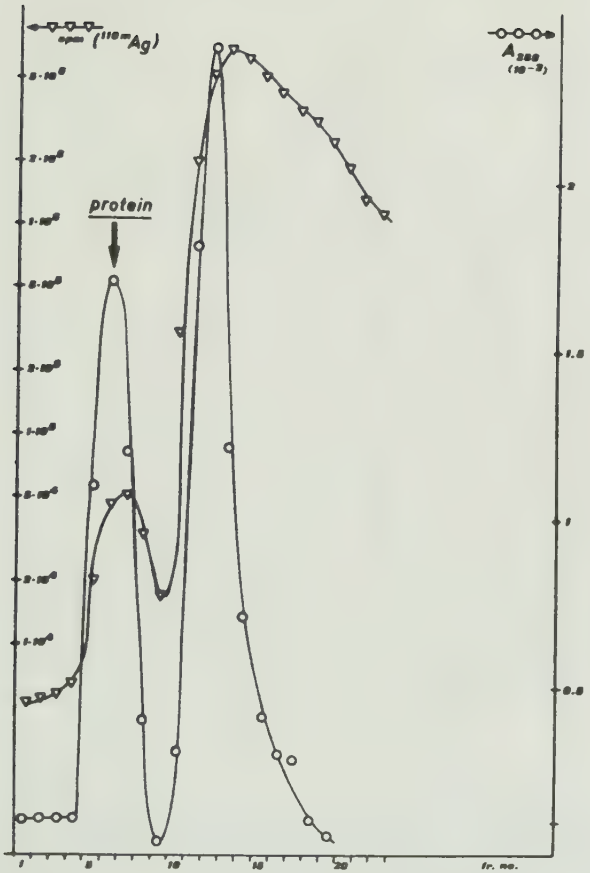


Abb. 4.11.: Sephadex G-25-Chromatographie einer mit $^{110m}Ag^+$-behandelten, substrat-reduzierten GSH-Peroxidase: Verlauf von Radioaktivität und Extinktion (A_{280}) bei 280 nm in den einzelnen Fraktionen. Ansatz: 3,2 nmol GSH-POD (330 U/mg) in 1 ml 5 mM MOPS + 40 nmol GSH (30 min, 37°C) + 4 µmol Ag^+ (^{110m}Ag/Ag wie 1:10); 10 min bei 37°C.

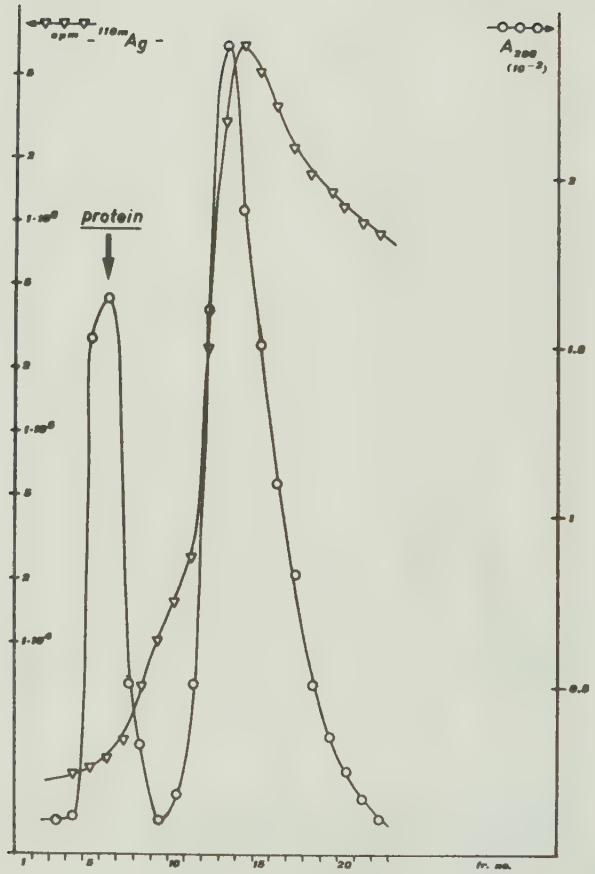


Abb. 4.12.: Sephadex G-25-Chromatographie von GSH-Peroxidase, die substratreduziert, mit Jodacetamid und anschließend mit $^{110m}Ag^{+}$ behandelt wurde: Verlauf von Radioaktivität und Extinktion (A_{280}) bei 280 nm in den einzelnen Fraktionen. Ansatz: 3,6 nmol GSH-POD (330 U/mg) in 1 ml 5 mM MOPS pH 7,4 + 40 nmol GSH (30 min, 37°C) + 80 nmol Jodacetamid (30 min, 37°C) + 4 µMol Ag^{+} ($^{110m}Ag/Ag$ wie 1:10) 10 min bei 37°C.

Veränderung des Enzyms bezüglich seiner enzymatischen Aktivität eintritt, ohne daß danach das Silber am Wirkungsort gebunden ist.

4.6. Ag^+-Wirkung und Selengehalt des Enzyms

Aus den vorangegangenen Experimenten ließ sich als eine Möglichkeit der Silberwirkung am Enzym ableiten: Das Silber eleminiert das für die Katalyse notwendige Selen aus dem Enzym.
Zur Untersuchung dieser Hypothese fanden mehrere Versuche mit Hilfe der Gelchromatographie von Ag^+-behandeltem Enzym statt, wobei verschiedene Vorbehandlungen des Enzyms ebenso berücksichtigt wurden. Neben der Verwendung von größeren Mengen an hochgereinigtem Enzym fand hier besonders die Selenanalytik mit Hilfe des fluorimetrischen Nachweises Anwendung. Diese ersten Experimente waren jedoch von dem nachteiligen Effekt begleitet, daß bei höheren Enzymkonzentrationen in den Ag^+-gehemmten Ansätzen stets ein proteinhaltiger Niederschlag auftrat. Da sich die Ergebnisse jedoch gut mit späteren Versuchen, bei denen diese Niederschlagsbildung vermieden werden konnte, vergleichen lassen, kommt ihnen eine gewisse Aussagekraft zu.

4.6.1. Sephadex G-25-Chromatographie nach Ag^+-Behandlung

Es wurden insgesamt 3 verschiedene Versuchsanordnungen gewählt, bei denen das Protein jeweils nach der Ag^+-Behandlung über eine Sephadex-G-25-Säule chromatographiert und von den niedermolekularen Bestandteilen befreit wurde. Zur Kontrolle wurde das Protein zunächst immer ohne Ag^+-Behandlung auf der gleichen Säule chromatographiert und dann erst die einzelnen Parameter bestimmt.

Versuch 1:

Zunächst wurde das unbehandelte Enzym nach der Sephadex G-25-Chromatographie analysiert. Die Messungen der enzymatischen Aktivität ergaben einen Wert von 370 U/mg Protein. Die Verteilung des Proteins auf die entsprechenden Fraktionen und den jeweiligen Selengehalt gibt die folgende Tabelle wieder, dabei wurden zu Vergleichszwecken zwei Fraktionen ohne Protein mitgetestet.

Fraktion	Proteingehalt (mg/ml)	Selengehalt (ng/ml)	Selen/Protein (ng/mg)
2	-	(40)	-
5	-	(36)	-
9	0,071	260	3662
10	0,342	1260	3684
11	0,213	800	3755
12	0,142	540	3802

Der größte Teil dieser Enzymlösung wurde dann lyophilisiert und weiterbenutzt. Nach Reduktion mit DTE und Behandlung mit Jodacetamid wurde die enzymatische Aktivität bestimmt, sie wurde mit 457 U/mg Protein berechnet.
Darauf erfolgte die Behandlung mit $AgNO_3$; in der Lösung konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Nach dem Sephadex G-25-Lauf wurden ebenso wie vorher die einzelnen Fraktionen auf Protein- und Selengehalt untersucht. Die folgende Tabelle gibt die entsprechenden Meßwerte wieder, und in der letzten Spalte ist der Selenanteil des Proteins im Vergleich zum Ag^+ unbehandelten Enzym in Prozent angegeben.

Fraktion	Proteingehalt (mg/ml)	Selengehalt (ng/ml)	Selen/Protein (ng/mg)	% Selen-anteil
2	-	(26)	-	-
5	-	(25)	-	-
9	0,033	40	1212	33 %
10	0,128	150	1171	31 %
11	0,084	92,5	1101	29 %
12	0,050	(150)	(3000)	

Aus diesen Experimenten ist deutlich ersichtlich, daß der Selengehalt des Enzyms nach der Ag^+-Inhibition auf etwa 30 % des ursprünglichen Wertes abnimmt.

Versuch 2:

In diesem Versuch wurde das Protein jeweils nur in einer Fraktion aufgefangen und daraus die jeweiligen analytischen Daten gewonnen.
Der erste Säulenlauf des unbehandelten Enzyms ergab einen Proteingehalt von 0,78 mg/ml und eine Selenkonzentration von 2975 ng/ml.
Diese Proteinlösung wurde mit GSH reduziert und dann mit Jodacetamid behandelt. Aus dieser Lösung wurde eine Probe zur Aktivitätsbestimmung entnommen, die einen Wert von 637 U/mg Protein ergab. Nach der entsprechenden Ag^+-Behandlung war lediglich eine Restaktivität von 18 U/mg Protein nachzuweisen. Die Analyse nach dem Sephadex G-25-Lauf ergab folgende Werte:

Protein: 0,238 mg/ml Selen: 230 ng/ml

Der entstandene Niederschlag konnte nach Auflösung in CN^- und Chromatographie ebenso einzelnen Analysen zugeführt werden:

Protein: 0,233 mg/ml Selen: 2735 ng/ml

Das Gesamtbild des Versuchsverlaufs soll folgende Tabelle darstellen:

	unbehandeltes Enzym	Ag^+ behandeltes Enzym	
		Überstand nach PD2-Lauf	Niederschlag nach PD2-Lauf
Protein (mg/ml)	0,78	0,238	0,233
Selen (ng/ml)	2975	230	635
Selen/Protein (ng/ml)	3810	966	2725
Selengehalt	100 %	25 %	72 %

Aus der Tabelle läßt sich folgendes ablesen: während im Überstand, also dem Enzymanteil, der nach Ag^+-Behandlung nicht ausfällt, der Selengehalt bei der Inhibition auf 25 % abnimmt, wird der Selengehalt im ausgefallenen Enzym weit weniger (nur auf 72 %) verringert. Da die Aktivitätsmessungen stets mit dem löslichen Überstand durchgeführt wurden, kann auch hier ein direkter Zusammenhang von Selengehalt und Aktivität und deren Beeinflussung durch Ag^+-Ionen hergestellt werden.

Versuch 3:

Da die Bindung von Silber an das Enzym durch die Jodacetamidvorbehandlung beeinflußt wird, sollte in diesem Versuch ohne eine solche Vorbehandlung gearbeitet werden. Nach dem ersten Sephadex G-25-Lauf wurde in der Proteinfraktion ein Proteingehalt von 1,06 mg/ml und eine Aktivität des Enzyms von 355 U/mg Protein ermittelt. Die Selenanalytik erbrachte einen Wert von 3800 ng Se/ml. Eine Messung der enzymatischen Aktivität nach der anschließenden Ag^+-Behandlung erbrachte keine meßbare Restaktivität. Darauf folgte der zweite Se-

phadex G-25-Lauf des Überstandes und die Werte der Proteinfraktion konnten wie folgt ermittelt werden:

Protein: 0,12 mg/ml Selen: 150 ng/ml.

Der gesamte Versuchsablauf ist wiederum tabellarisch zusammengefaßt:

	unbehandeltes Enzym	Ag^+-behandeltes Enzym
Protein (mg/ml)	1,06	0,12
Selen (ng/ml)	3800	150
Selen/Protein (ng/mg)	3584	1250
Selengehalt	100 %	34 %

Wie aus allen drei Versuchen zu ersehen ist, ist die Silberhemmung des Enzyms stets mit einem Selenverlust von ca. 70 % des Selens begleitet. Interessant ist, daß nie alles Selen aus dem Protein eleminiert wurde. Auf die Reaktion als solche haben alle untersuchten Vor- und Nachbehandlungen keinen Einfluß, es bleiben immer ca. 30 % des Selens im Enzym.

4.6.2. Sephadex G-150-Chromatographie des Ag^+-behandelten Enzyms

Die enzymatische Aktivität im Reaktionsansatz wurde nach Jodacetamidbehandlung getestet und ergab einen Wert von 425 U/mg Protein. Nach der Ag^+-Behandlung konnte keine Aktivität im Überstand nachgewiesen werden. Letzterer wurde nach einem Sephadex G-25-Lauf lyophilisiert und nach Auflösung in Puffer wurde die Proteinkonzentration zu 0,595 mg/ml und die Selenkonzentration zu 530 ng/ml bestimmt. Diese

Lösung wurde auf einer Sephadex G-150-Säule chromatographiert. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und die entsprechenden Meßwerte sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Fraktion	Protein (mg/ml)	Selen (ng/ml)	Selen/Protein (ng/mg)
30	0,008	-	-
31	0,016	14,2	888
32	0,026	17,1	658
33	0,030	21,4	714
34	0,037	28,6	773
35	0,038	22,2	584
36	0,043	17,1	397
37	0,041	25,7	630
38	0,041	35,7	870
39	0,038	27,1	713
40	0,035	27,1	774
41	0,034	15,7	462
42	0,028	15,7	561
43	0,023	-	-
44	0,018	-	-

Wenn man von der durch die niedrigen Proteinkonzentrationen bedingten Meßungenauigkeit absieht, läßt sich eine gewisse Korrelation zwischen Protein und Selen herstellen. Nimmt man den Mittelwert von 669 ng Se/mg Protein, so zeigt sich auch hier, daß noch rund 18 % des Selens nach der Silber- und kurzer Cyanidbehandlung im Enzym verblieben sind.

4.7. Silberwirkung auf Selenoaminosäuren

Im Experiment waren die entsprechenden Selenoaminosäuren mit einer $AgNO_3$-Lösung behandelt worden. Nach 3 Stunden zeigte sich keine rein optisch wahrnehmbare Veränderung der Reaktionsansätze. Auch auf den Dünnschicht-Chromatogrammen war außer einer Schwanzbildung bei den Ag^+-behandelten Proben kein unterschiedliches Laufverhalten festzustellen. Für Selenocystin muß letztere Aussage jedoch eingeschränkt werden, da es in dem benutzten Laufmittelsystem nur ungenügend vom Auftragspunkt weggewandert war.
Erstaunlicherweise zeigte jedoch eine Untersuchung der über Nacht im Dunklen aufbewahrten Lösungen einige Veränderungen. Die Lösung des Selenocystin (ohne Ag^+) enthielt einen roten Niederschlag, der sicherlich ausgefallenes Selen darstellte. Die beiden anderen Aminosäure-Lösungen zeigten keine Veränderung. Dafür war jedoch ein grauschwarzer Niederschlag in dem Ansatz von Selenocystin mit dem Ag^+ festzustellen, der wiederum nicht in den beiden anderen Ansätzen aufgetreten war. Da die Selenocystinlösung zusätzlich mit HNO_3 versetzt worden war, die bekanntlich elementares Silber auflöst, kann daraus der Schluß gezogen werden, daß es sich bei dem Niederschlag nur um entstandenes Ag_2Se handeln kann, von dem eine Vergleichsprobe vorlag.

4.8. Titrationen der GSH-Peroxidase - Ag^+-ionensensitive Elektrode

Da in diesen Ergebnissen quantitative Auswertungen gemacht werden sollten, war es zunächst unumgänglich, zu Eichzwekken Titrationen mit Modellverbindungen durchzuführen. Außerdem sollte der Einfluß der 3,85 M GuAc-Lösung auf das Elektrodenverhalten untersucht werden. Dieses Reagenz erwies sich zudem als geeignet, die in früheren Experimenten beobachtete Tendenz des Proteins zum Ausfallen während der Ag^+-Behandlung zu verhindern.

4.8.1. Titration von GSH mit und ohne 3,85 M GuAc

Der Verlauf der Titrationen ist in Abb. 4.13. in halblogarithmischer Darstellung wiedergegeben. Dabei fällt deutlich eine Verschiebung und Formveränderung der Kurve in Abhängigkeit von der Ionenstärke auf. Da in beiden Vorlagen jeweils eine Konzentration von $2,5 \cdot 10^{-5}$ M an GSH titriert wurde, ergibt sich nur für die Kurve ohne 3,85 M GuAc ein Äquivalenzpunkt am Wendepunkt der Kurve. Da die Ermittlung dieses Wendepunktes meistens entweder nach rein optischen oder graphischen Verfahren erfolgt[158], soll hier mit einem rechnerischen Verfahren eine exaktere Auswertung angewandt werden. Dazu wurde die Methode nach GRAN[158,162] benutzt. Die entsprechenden Diagramme sind in Abb. 4.14. (ohne 3,85 M GuAc) und Abb. 4.15. (mit 3,85 M GuAc) wiedergegeben. Dabei wird die Abhängigkeit des Gran-Faktors (Π) von dem zugegebenen Titrationsvolumen dargestellt. Dieser Gran-Faktor ist das Produkt aus Gesamttitrationsvolumen (V_G) und einem errechneten Wert (pX):

$$\Pi = V_G \cdot pX$$

wobei in dem vorliegenden Fall aus dem jeweiligen Potential der Ag^+-Elektrode der entsprechende Wert für pX wie folgt errechnet wird:

$$pX = 10^{\frac{E}{59,16}}$$

Der Äquivalenzpunkt der Titration läßt sich in dem Gran-Diagramm relativ einfach am Schnittpunkt der Geraden durch die Volumenachse festlegen, der das Äquivalenzvolumen der Titrationslösung angibt.
Durch diese Auswertungsmethode ergeben sich für die beiden Titrationen folgende Werte:

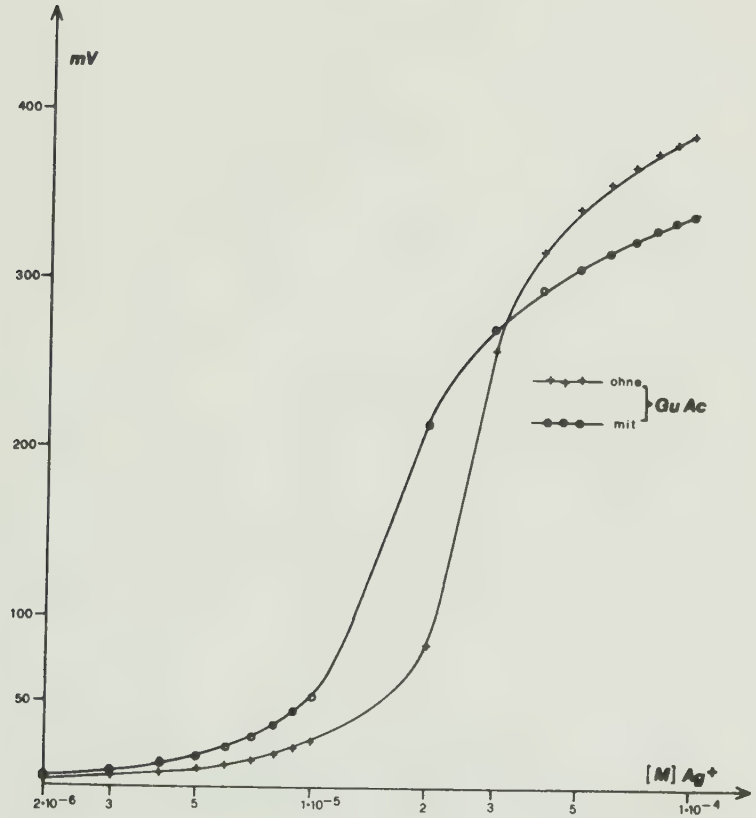


Abb. 4.13.: Titrationsverlauf einer $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ M GSH-Lösung mit und ohne Anwesenheit von 3,85 M GuAc: Potential der Ag^+-Elektrode in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration (halblogarithmische Darstellung).
Bedingungen: 2 ml Meßvolumen, 0,1 m MOPS pH 7,2

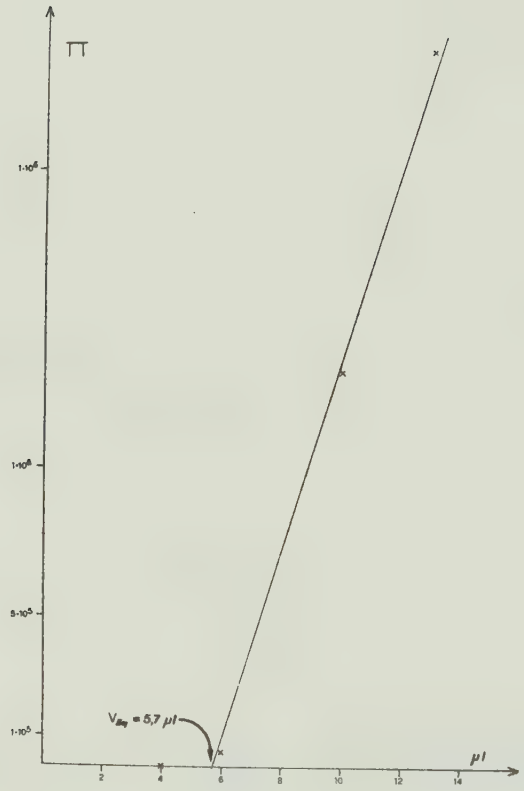


Abb. 4.14.: Gran-Plot zu der Titration einer $2,5 \cdot 10^{-5}$ M GSH-Lösung ohne GuAc. Bedingungen wie bei Abb. 4.13.

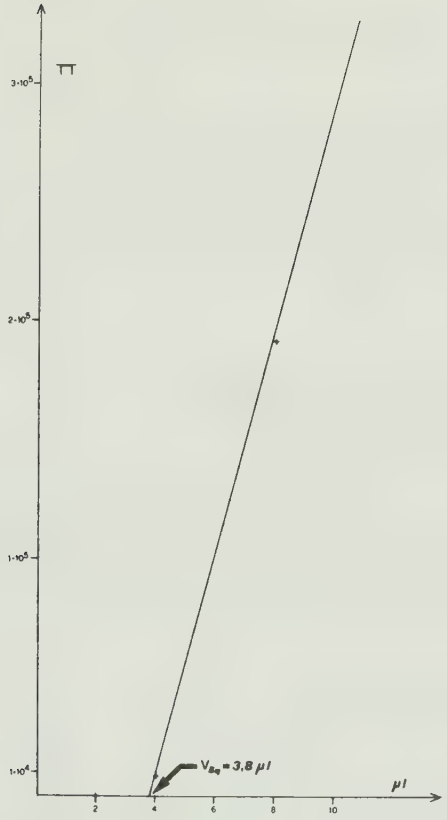


Abb. 4.15.: Gran-Plot zu der Titration einer $2,5 \cdot 10^{-5}$ M GSH-Lösung in 3,85 M GuAc.
Bedingungen wie bei Abb. 4.13.

1. Titration (ohne GuAc):

$V_{Äq} = 5{,}7\ \mu l \triangleq 2{,}85 \cdot 10^{-5}\ M\ Ag^+$

2. Titration (mit GuAc):

$V_{Äq} = 3{,}8\ \mu l \triangleq 1{,}9 \cdot 10^{-5}\ M\ Ag^+$

Soll:

$2{,}5 \cdot 10^{-5}\ M$

Während also die erste Titration mit einer +12 %igen Abweichung den Äquivalenzpunkt ermitteln läßt, weicht der Wert der zweiten Titration schon stärker ab (-24 %). Auf diese Abweichung soll im Anschluß an eine Titration von Mercaptoäthanol, die das gleiche Verhalten zeigt, näher eingegangen werden.

4.8.2. Titration von Mercaptoäthanol mit und ohne 3,85 M GuAc

Der Verlauf der Titrationskurven ist in Abb. 4.16. dargestellt. Wiederum ergibt sich das gleiche Verhalten von Kurvenform und Lage in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Die entsprechenden Auswertungen nach GRAN sind in den Diagrammen (Abb. 4.17.und Abb. 4.18.) wiedergegeben. Daraus ergeben sich folgende Werte:

1. Titration (ohne GuAc):

$V_{Äq} = 5{,}1\ \mu l \triangleq 2{,}55 \cdot 10^{-5}\ M\ Ag^+$

2. Titration (mit GuAc):

$V_{Äq} = 3{,}8\ \mu l \triangleq 1{,}9 \cdot 10^{-5}\ M\ Ag^+$

Soll:

$2{,}5 \cdot 10^{-5}\ M$

Dabei zeigt die erste Titration nur eine Abweichung von +2 %, während die zweite Titration wiederum eine Abweichung von -24 % zeigt.
Aus den Titrationsergebnissen läßt sich zu den Werten ohne GuAc feststellen, daß die ermittelten Äquivalenzpunkte jeweils eine Abweichung zu höheren Werten aufweisen, was

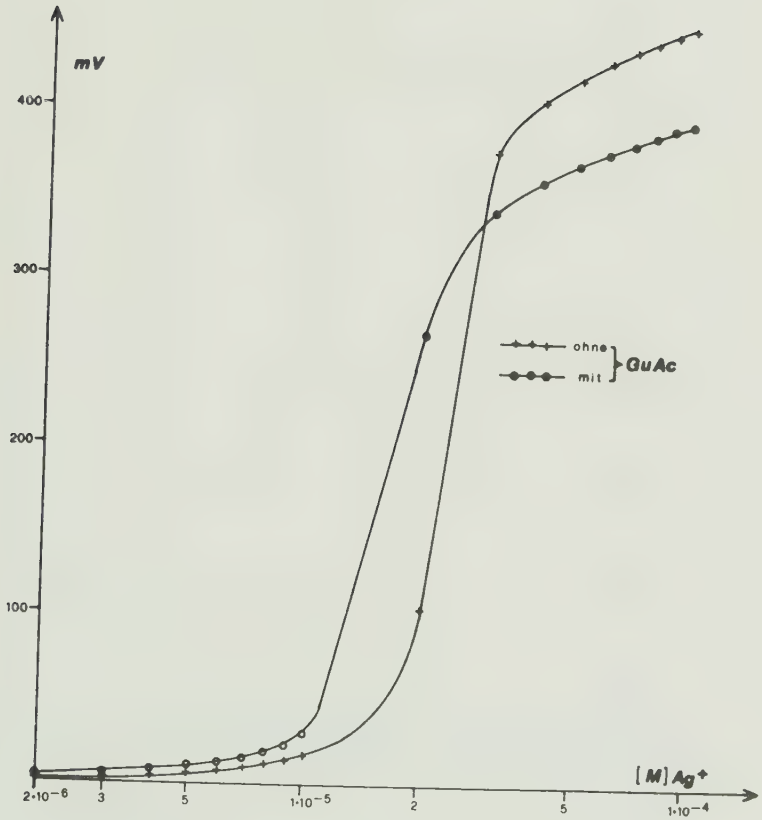


Abb. 4.16.: Titration einer $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoäthanol-Lösung mit und ohne Anwesenheit von 3,85 M GuAc:
Potential der Ag^+-Elektrode in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration (halblogarithmische Darstellung)
Bedingungen: 2 ml Meßvolumen, 0,1 M MOPS pH 7,2

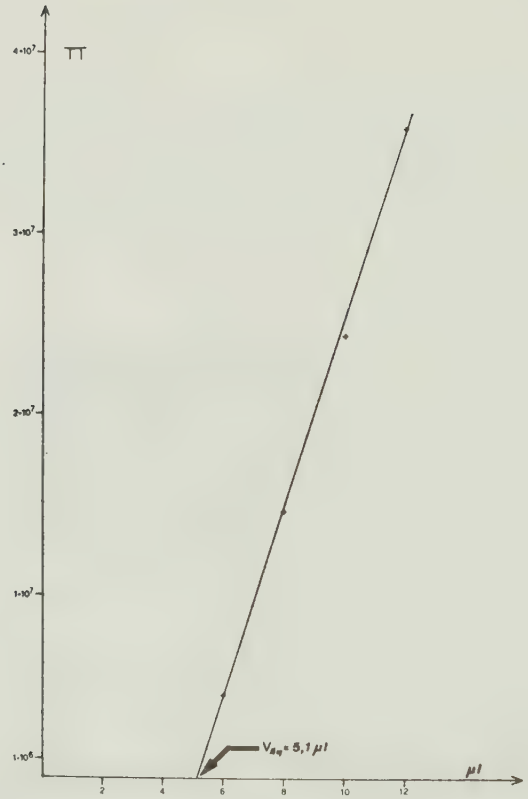


Abb. 4.17.: Gran-Plot zu der Titration einer $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoäthanol-Lösung ohne GuAc. Bedingungen wie bei Abb. 4.16.

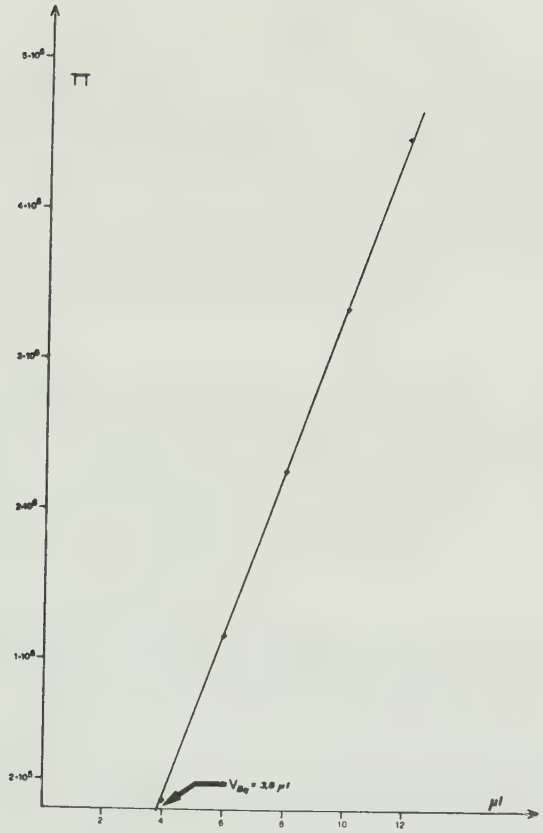


Abb. 4.18.: Gran-Plot zu der Titration einer $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoäthanol-Lösung in 3,85 M GuAc. Bedingungen wie bei Abb. 4.16.

auch eine typische und vielfach beobachtete Tendenz dieser Methode ist[108,163,164]. Die negativen Abweichungen bei den Titrationen in 3,85 M GuAc sind jedoch auf den Einfluß der Ionenstärke zurückzuführen.

Dieser Einfluß der Ionenstärke auf den Aktivitätskoeffizienten und damit auf das Potential der Elektrode kann nach DEBYE-HÜCKEL unter Anwendung der Näherungsformel von KIELLAND[34] wie folgt berechnet werden. Dabei findet die Berechnung der Aktivitätskoeffizienten nach folgender Formel statt:

$$\lg f = - \frac{A \cdot z^2 \cdot J^{1/2}}{1 + B \cdot k \cdot J^{1/2}}$$

worin

A, B = Lösungsmittel- und temperaturabhängige Konstanten (siehe [165])

k = Parameter, der mit der Größe der Hydrathülle des Ions zusammenhängt

z = Ionenladung

J = Ionenstärke, die sich aus $J = 0{,}5 \cdot \quad \cdot z_i^2 \cdot C_i$ berechnen läßt

Setzt man die entsprechenden Größen in die Gleichung ein, so ergeben sich folgende Aktivitätskoeffizienten des Ag^+-Ions:

a) für eine 0,1 M Lösung: f = 0,805
mit A = 0,514; B = 0,33; k = 3; J = 0,2236

b) für eine 3,85 M Lösung: f = 0,499
mit A = 0,514; B = 0,33; k = 3; J = 1,405

Daraus folgt, daß sich die Aktivitätskoeffizienten um den Faktor 1,613 unterscheiden. Für die Bestimmung der Äquivalenzpunkte sind in den angegebenen Diagrammen jedoch die Aktivitäten der Ag^+-Ionen maßgebend, die Diagramme stellen

jedoch jeweils die Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen dar. Da sich die Aktivitäten nach

$$a = f \cdot c$$

berechnen lassen, folgt daraus, daß die Aktivitätsskala bei den 3,85 M-Lösungen um den Faktor 1,61 zu kleineren Werten verschoben ist, d.h. zur Äquivalenzpunktsermittlung müssen die Konzentrationen am rechnerisch ermittelten Äquivalenzpunkt mit dem Faktor 1,61 multipliziert werden. Die praktisch ermittelte Abweichung ergibt jedoch nur einen Faktor von 1,31. Damit ergibt sich ein für die Berechnung der Äquivalenzpunkte ermittelter Faktor von

$$rf = 1{,}31 \quad (rf = \text{relativer Aktivitätskoeffizient})$$

wobei hier der experimentell ermittelte Wert genommen wurde, da der rein theoretisch ermittelte Wert zwar höher ausfällt, möglicherweise aber dabei nicht alle Störfaktoren berücksichtigt worden sind.

4.8.3. Titration der GSH-Peroxidase

Die folgenden Titrationen sollten dazu dienen, den Äquivalenzpunkt der Reaktion und damit eine stöchiometrische Betrachtung der Ag^+-Wirkung auf das Enzym zu ermöglichen. Begleitend zur Titration sollte das Verhalten des Selengehaltes des Enzyms und der enzymatischen Aktivität sowie der molekularen Eigenschaften des Proteins untersucht werden.

4.8.3.1. Titration in 3,85 M GuAc

Eine erste Titration in 3,85 M GuAc diente zur Erprobung dieses Lösungsmittelsystemes, wobei gleichzeitig mit Hilfe der Selenanalytik die Ag^+-Wirkung überwacht wurde.
Nach dem Sephadex G-25-Lauf wurde das Eluat auf Protein-

und Selengehalt untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte: 0,235 mg Protein/ml und 822 ng Se/ml. Diese Lösung wurde auf 1/4 verdünnt in 3,85 M GuAc mit Ag^+ titriert. Das Ergebnis dieser Titration gibt Abb. 4.19. wieder. Neben der Titrationskurve des Proteins ist auch die der Elektrode (ohne Protein) dargestellt. Der Verlauf der Kurve ist jedoch relativ flach, so daß auf eine quantitative Auswertung we-

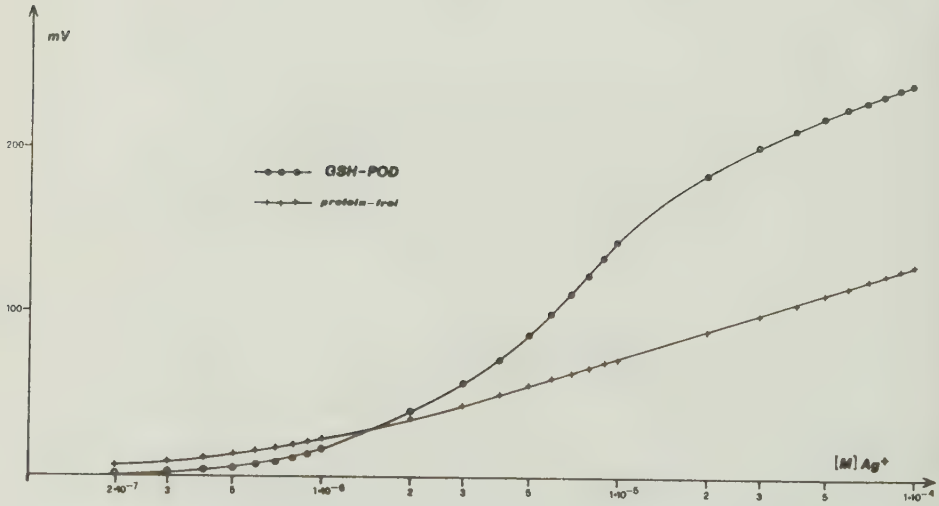


Abb. 4.19.: Titration einer GSH-Peroxidase-Lösung (0,059 mg/ml; 355 U/mg) in 3,85 M GuAc mit Ag^+-Lösungen: Verlauf des Elektrodenpotentials in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration (halblogarithmische Darstellung); zum Vergleich Verlauf einer Titration einer proteinfreien Lösung.
Bedingungen: 2 ml Meßvolumen, 0,1 M MOPS pH 7,2.

gen der enormen Fehlerbreite hier verzichtet wurde. Nach der Titration wurde ein Teil der Lösung auf Sephadex G-25 chromatographiert und im Eluat Analysen durchgeführt. Der Proteingehalt war 0,03 mg/ml und die Lösung enthielt 39,4 ng Se/ml.
Während vor der Titration 3498 ng Se in 1 mg GSH-Peroxidase enthalten war, enthielt das Protein nach der Ag^+-Behandlung, bei der in diesem Experiment keine Niederschlagsbildung auftrat, und nach entsprechender Aufarbeitung nur noch 1313 ng Se/mg Protein, das sind 37,5 % des ursprünglichen Selengehaltes.

4.8.3.2. Titration bei erhöhter Proteinkonzentration

Um einen besseren Verlauf der Titrationskurve für eine entsprechende quantitative Auswertung zu erhalten, war es notwendig, zunächst zu versuchen, bei höheren Proteinkonzentrationen zu arbeiten. Da dafür aber ebenso eine höhere Ag^+-Konzentration zu erwarten war, wurde das Verhalten des Lösungsmittelsystems bei höheren Ag^+-Konzentrationen untersucht. Leider stellte sich heraus, daß bei 10^{-3} M Ag^+ eine leichte Trübung auftrat, deswegen wurde nicht höher als 10^{-4} M Ag^+ titriert.
Das über eine Sephadex G-25-Säule aufgearbeitete Protein wurde analysiert. Die Proteinfraktion enthielt 1,68 mg Protein/ml und 6010 ng Se/ml. Eine Messung der enzymatischen Aktivität erbrachte einen Wert von 331 U/mg Protein. Nach der Einstellung der Lösung auf 3,85 M GuAc erfolgte die Titration, deren Verlauf in Abb. 4.20. dargestellt ist. Aus dem Kurvenverlauf ist zu ersehen, daß die Titration keine vollständige Titrationskurve ergab. Dann wurde der Titrationsansatz aufgearbeitet und Protein- und Selenkonzentration bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Werte: 0,29 mg Protein/ml und 591 mg Se/ml.
Wenn die Werte vor der Titration (3577 ng Se/mg Protein) mit denen nach der - unvollständigen - Titration (2038 ng Se/mg Protein) verglichen werden, so fällt auf, daß nur

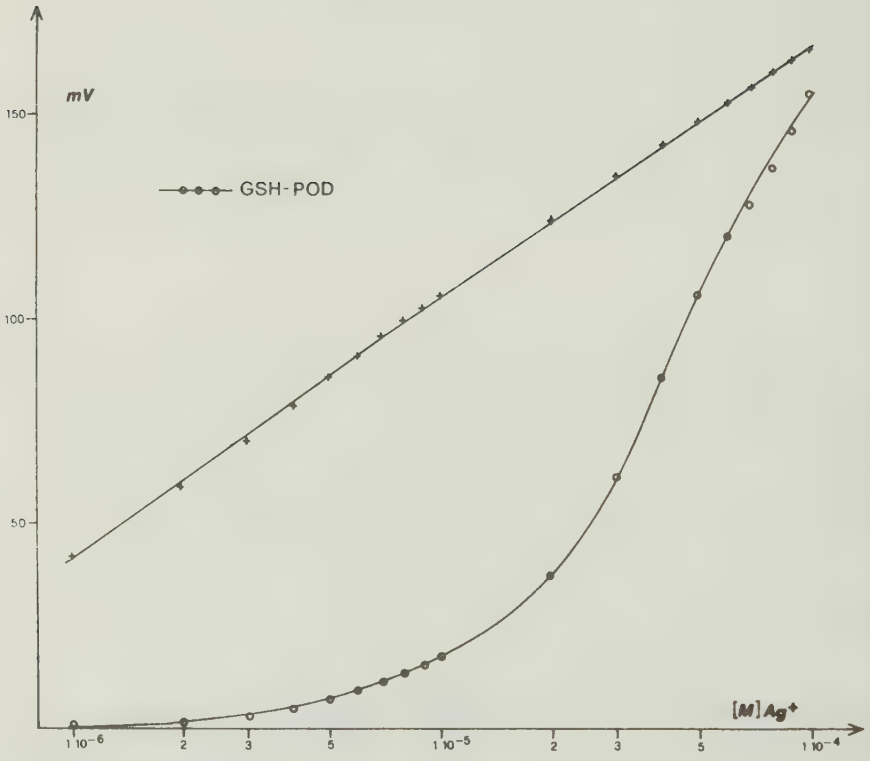


Abb. 4.20.: Titration (unvollständig) einer GSH-POD-Lösung (0,81 mg/ml; 331 U/mg) in 3,85 M GuAc mit Ag^+-Lösungen: Verlauf des Elektrodenpotentials in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration (halblogarithmische Darstellung); zum Vergleich Verlauf bei einer proteinfreien Lösung.
Bedingungen: 2 ml Meßvolumen, 0,1 M MOPS pH 7,2

43 % des Selens bei dieser Behandlung verloren gingen. Daraus folgt, daß eine Ag^+-Behandlung mit zu geringer Silberkonzentration sich auch in einem geringeren Selenverlust niederschlägt.

4.8.3.3. Titration mit stöchiometrischer Auswertung, Aktivitätskontrolle, Selenanalytik sowie Gelelektrophoresen des Proteins

Nachdem die vorausgegangenen Experimente eine Optimierung der Versuchsbedingungen ermöglicht hatten, wurde dieser Versuch von allen analytischen Methoden, die zu einem möglichst guten Überblick über die Eigenarten der Ag^+-Inhibition führen sollten, begleitet.
Die Aufarbeitung der GSH-Peroxidase erfolgte bisher durch eine Sephadex G-25 Chromatographie. Die Proteinfraktion wurde nun verschiedenen Analysen zugeführt und ein Teil für die entsprechenden Gelelektrophoresen vorbereitet. Die einzelnen Meßergebnisse ergaben folgende Werte:

Protein	0,34 mg/ml
Selen	1221 ng/ml
Spez. Aktivität	312 U/mg Protein.

Daraus erfolgte nach entsprechender Verdünnung in 3,85 M GuAc die Titration mit Ag^+-Ionen. Der Verlauf der Titration ist in Abb. 4.21. wiedergegeben. Jeder dritte Titrationsschritt wurde von einer Kontrolle der enzymatischen Aktivität begleitet, die entsprechenden Werte sind ebenso in dem Diagramm dargestellt.
Die Bestimmung des Äquivalenzpunktes erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode nach GRAN. Das entsprechende Diagramm ist in Abb. 4.22. wiedergegeben. Die graphische Auswertung ergibt einen unkorrigierten Wert von $2,4 \cdot 10^{-5}$ M Ag^+; nach Multiplikation mit dem zuvor ermittelten Faktor von 1,31 ergibt sich daraus der Äquivalenzpunkt der Titration zu $3,14 \cdot 10^{-5}$ M Ag^+. Da die Vorlage $2,62 \cdot 10^{-6}$ M an

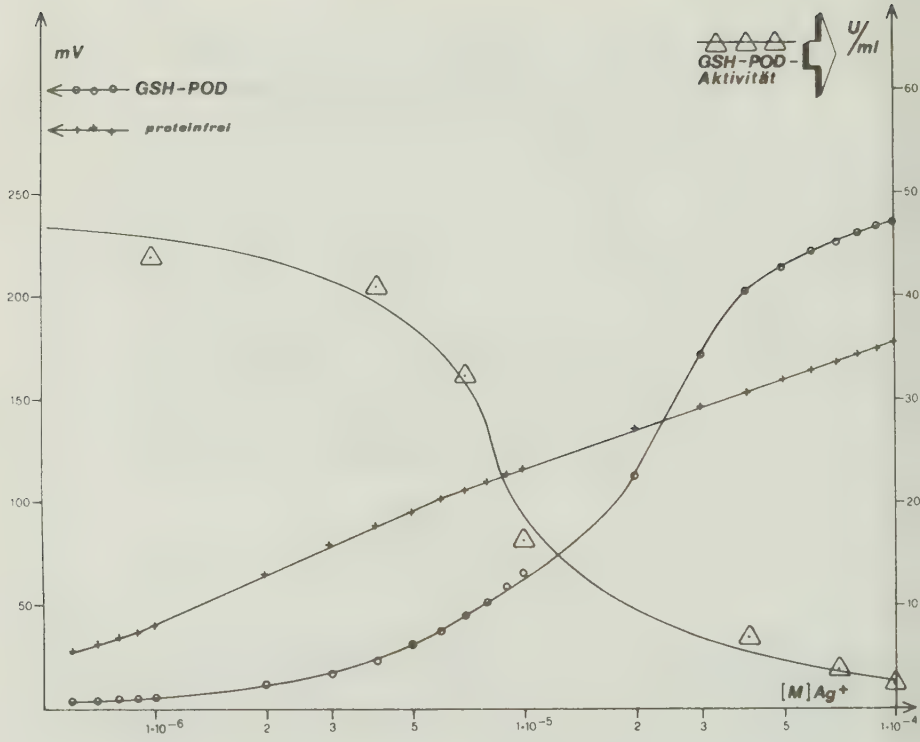


Abb. 4.21.: Titration einer $2{,}62 \cdot 10^{-6}$ M GSH-Peroxidase-Lösung (Spez. Aktivität: 312 U/mg) in 3,85 M GuAc mit Ag^+-Lösungen: Verlauf des Elektrodenpotentials und der GSH-POD-Aktivität in gleichen Teilproben in Abhängigkeit von den Ag^+-Konzentrationen (halblogarithmische Darstellung); zum Vergleich Verlauf des Potentials einer proteinfreien Lösung.
Bedingungen: 2 ml Meßvolumen, 0,1 M MOPS pH 7,2.

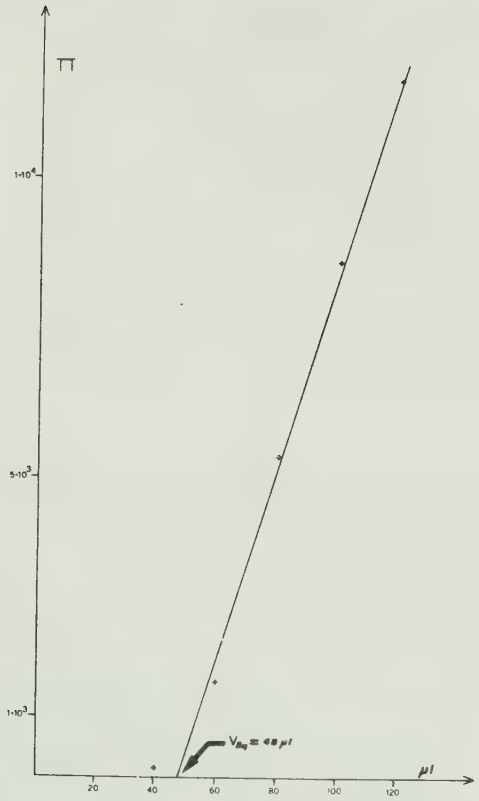


Abb. 4.22.: Gran-Plot zur Titration einer 2,62 · 10^{-6} M GSH-POD-Lösung in 3,85 M GuAc. Bedingungen wie bei Abb. 4.21.

GSH Peroxidase (≙ 0,22 ng/ml) war, kann aus beiden Zahlen die Stöchiometrie der Reaktion ermittelt werden. Daraus folgt, daß 11,98 Mole Ag^+ mit 1 Mol GSH-Peroxidase reagieren.
Ein Teil des Titrationsansatzes wurde wiederum auf Sephadex G-25 chromatographiert und den entsprechenden Analysen zugeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte:
Protein 0,069 mg/ml; Selen 65,36 ng/ml.
Die Ergebnisse der quantitativen Aspekte des Versuchs sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

	Protein mg/ml	Selen ng/ml	Selengehalt ng/mg	Selengehalt %
unbehandelte GSH-POD	0,34	1221	3591	100 %
Ag^+-behandelte GSH-POD	0,069	65,36	947	26,4 %

Stöchiometrie der Ag^+-Reaktion: 12 Ag^+/GSH-POD

Ein weiterer Teil des Titrationsansatzes wurde durch mehrmaliges Dialysieren gegen die entsprechenden Auftragpuffer für die Gelelektrophoresen aufgearbeitet. Die entsprechenden Gele wurden nach Anfärbung mit Coomassie Brillant Blue R 250 im Durchlicht fotographiert. Die entsprechenden Fotographien sind in Abb. 4.23. und 4.24. wiedergegeben.
Zu Abb. 4.23., in der das Disk-Elektrophorese-Gel abgebildet ist, soll folgendes erläutert werden: Die Proteinbande des unbehandelten Enzyms ist zwar nicht optimal aufgelöst, jedoch läßt sich ein eindeutig anderes Laufverhalten gegenüber dem Ag^+-behandelten Enzym ablesen. Letzteres ist über eine große Strecke verteilt als unscharfer Bereich, was möglicherweise auch durch nicht vollständig entfernte Ag^+-Ionen bedingt sein kann. Um ein besser interpretierbares Bild zu erhalten, wurde die in Abb. 4.24. wiedergegebene SDS-Gel-Elektrophorese angefertigt. Bei diesem Bild kann

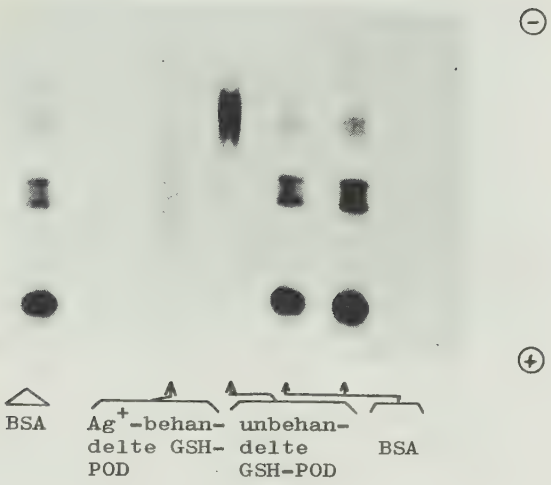


Abb. 4.23.: Disk-Elektrophorese der unbehandelten GSH-Peroxidase und der Ag^+-behandelten GSH-Peroxidase im Vergleich zu Rinderserumalbumin (BSA) Auftrag: ca. 10-50 µg Protein

man erkennen, daß ein großer Anteil des unbehandelten Enzyms in Form von Monomeren vorliegt, wobei ein kleiner Anteil von Tetrameren - aber keine andere Form - ebenso vorhanden ist.
Bei der Ag^+-behandelten Charge läßt sich neben einem überwiegenden Anteil von Protein im Monomerenbereich eine Bande nahe dem Tetramerenbereich und eine zweite unterhalb (also kleineres Molekulargewicht) des Monomerenbereiches sowie die zweitstärkste Bande zwischen den beiden Bereichen erkennen. Daraus folgt, daß nach der Ag^+-Behandlung das Protein zu einem Teil in Produkte zerfällt oder umgelagert wird, die ein Laufverhalten wie kleinere Bruchstücke und ebenso wie höhermolekulare Aggregate ergeben.

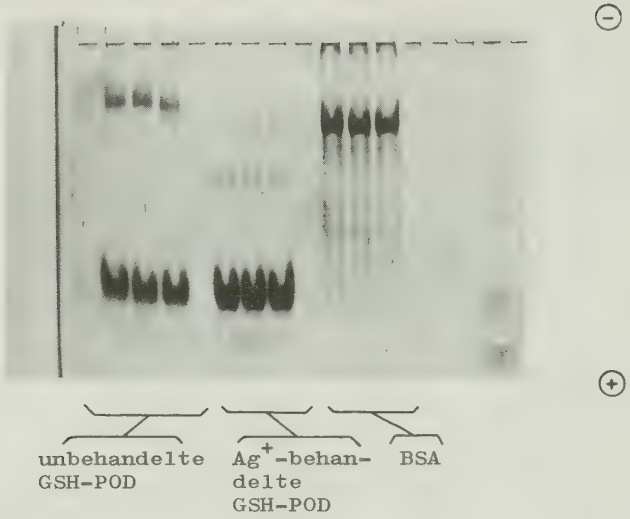


Abb. 4.24.: SDS-Gel-Elektrophorese der unbehandelten und Ag^+-behandelten GSH-Peroxidase im Vergleich zu Rinderserumalbumin (BSA). Auftrag: ca. 5-40 µg Protein.

4.8.3.4. Weitere Titration mit stöchiometrischer Auswertung

Da eine weitere Interpretation der Ag^+-Inhibition sich auf die wesentliche Frage der Stöchiometrie der Reaktion stützen muß, diente eine zweite Titration zur weiteren Festlegung des Äquivalenzpunktes. Von einer aufgearbeiteten GSH-Peroxidaselösung mit 0,53 mg Protein/ml wurde durch Verdünnung auf 0,169 mg Protein/ml in 3,85 M GuAc eine entsprechende Lösung für die Titration vorbereitet.
Der Verlauf der Titration ist in Abb. 4.25 dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Gran-Diagrammes, das in Abb. 4.26. wiedergegeben ist. Daraus ergibt sich ein Äquivalenzpunkt von $1{,}75 \cdot 10^{-5}$ M Ag^+ (unkorrigiert) und nach Multiplikation mit dem zuvor ermittelten Korrekturfaktor von 1,31 ein Äquivalenzpunkt bei

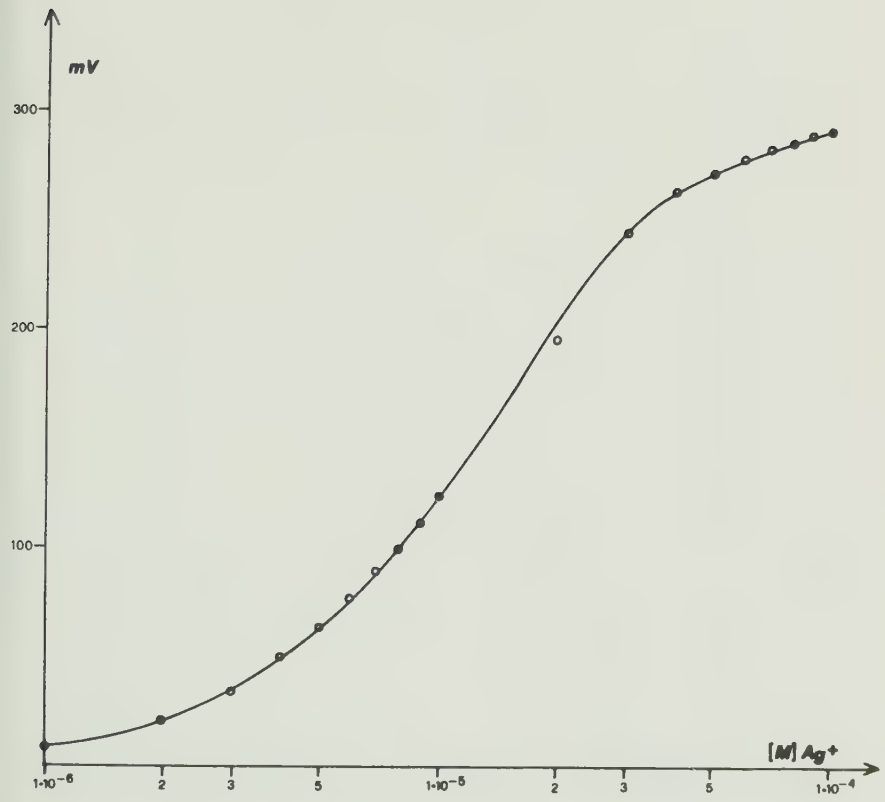


Abb. 4.25.: Titration einer $2{,}0 \cdot 10^{-6}$ M GSH-POD-Lösung (331 U/mg) in 3,85 M GuAc mit Ag^+-Lösungen: Verlauf des Ag^+-Elektrodenpotentials in Abhängigkeit von der Ag^+-Konzentration (halblogarithmische Darstellung).
Bedingungen: 2 ml Meßvolumen, 0,1 M MOPS pH 7,2.

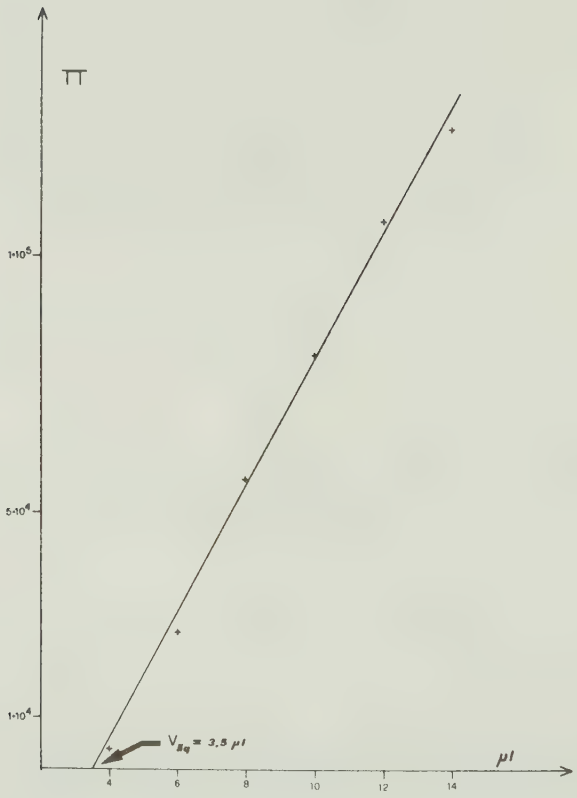


Abb. 4.26.: Gran Plot zur Titration einer $2,0 \cdot 10^{-6}$ M GSH-Peroxidase-Lösung in 3,85 M GuAc. Bedingungen wie bei Abb. 4.25.

$2{,}29 \cdot 10^{-5}$ M Ag^+. Bei einer Proteinkonzentration von 0,169 mg/ml ergibt sich für die GSH-Peroxidase eine Molarität von $2{,}0 \cdot 10^{-6}$ M und eine Stöchiometrie von 11,45 Mole Ag^+ pro Mol GSH-Peroxidase oder genähert von

12 Mole Ag^+ / Mol GSH-POD.

Damit bestätigt diese zweite Titration in guter Übereinstimmung den bereits zuvor ermittelten Wert.

5. Diskussion

5.1. Zu den Inhibitionsstudien mit der Glutathionperoxidase

In Anlehnung an die Modellvorstellung, daß die aktive Selenkomponente der GSH-Peroxidase eine mit dem Proteingerüst kovalent verbundene Komponente, möglicherweise sogar eine Selenoaminosäure, ist[17, 20], wurde die Möglichkeit einer γ-Glutamylbindung untersucht. Das Enzym γ-Glutamyltranspeptidase[151] besitzt die Fähigkeit, diese Bindung zumindest bei kleineren Peptiden zu spalten. Ein Einwirken dieses Enzyms auf die GSH-Peroxidase ergab keine eindeutige Hemmwirkung. Daraus kann zweierlei gefolgert werden: Erstens, daß in dem Enzym GSH-Peroxidase die aktive Selenkomponente nicht über eine γ-Glutamylbindung mit dem Proteinrest verbunden ist oder zweitens, daß, falls eine solche Bindung vorliegt, diese nicht von dem Enzym γ-Glutamyltranspeptidase gespalten wird.

Der zweite Weg zur Untersuchung der Selenkomponente der GSH-Peroxidase über Inhibitionsstudien ging einerseits von der bereits einleitend vorgestellten Tatsache des Selenantagonismus von bestimmten Schwermetallen sowie andererseits von der rein theoretisch abgeleiteten Feststellung aus, daß Elemente der sogenannten "soft acid"-Klasse[45] besonders starke Affinität für Selen aufweisen.

Die Inhibitionsstudien erbrachten jedoch außer bei Silber mit keinem der anderen als Selenantagonisten bekannten Elemente eine Hemmwirkung auf das Enzym Glutathionperoxidase. Die möglicherweise vorhandene Hemmwirkung von Au^+ und Cu^+, die sich jedoch auf Experimente mit festen Stoffen stützt, soll nicht weiter interpretiert werden, da in den Versuchen nicht alle Störfaktoren erfaßt werden konnten. Dagegen ist die eindeutige Hemmwirkung von J_2 und Br_2 im Gegensatz zu J^- und Br^- bei der nichtreduzierten Enzymspezies der GSH-Peroxidase nachgewiesen worden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Aussage, die sich aus der theoretischen Abhandlung

von PEARSON[45] ergibt: J_2 und Br_2 sind "soft class"-Säuren, während J^- und Br^- zu den "soft class"-Basen gehören und letztere somit keine Affinität für die "soft class"-Base Selen haben.
Diese Überlegunen und die Ergebnisse passen jedoch nur zusammen, wenn das Selen in der aktiven Komponente der Glutathionperoxidase in einer der folgenden Formen vorliegt:

Se^{2-} RSe^- RSeH R_2Se.

5.2. Silber als Inhibitor der Glutathionperoxidase

Es konnte nachgewiesen werden, daß sich die Hemmwirkung des Silbers auf die GSH-Peroxidase deutlich von den anderen Schwermetallen unterscheidet: es ergibt sich eine totale Hemmung. Dabei ergab sich, daß die Inhibitionsreaktion sehr schnell verläuft, von der Enzymform unabhängig ist und wahrscheinlich durch das Ag^+-Ion bewirkt werden könnte. Neben Ag^+-Ionen zeigten auch der $(AgCN)CN^-$-Komplex sowie trägergebundenes AgCl eine Inhibitionswirkung auf das Enzym. Darin manifestiert sich die hohe Affinität einer für die enzymatische Funktion essentielle Gruppe der GSH-Peroxidase für Silber. Neben der bekannten Eigenschaft von Sulfhydrylgruppen haben auch verschiedene Selenverbindungen eine hohe Reaktivität gegenüber Ag^+.
Zunächst wurde die Bindung von Silber an verschiedene Enzymspezies (reduziert, mit Jodacetamit behandelt) untersucht. Der in Abb. 4.12. dargestellte Versuch zwingt zu der Annahme, daß eine Inhibitorwirkung von Ag^+ auch ohne dauerhafte Bindung an das Enzym erfolgt. Daraus und aus der Tatsache, daß die Inhibition irreversibel verläuft, sollte die Reaktion unter dem spekulativen Aspekt betrachtet werden, daß das Ag^+ möglicherweise die Eliminierung des für die Reduktions-Oxidationsvorgänge im Enzym verantwortlichen Selens bewirkt. Diese Hypothese soll später anhand eines Modells erörtert werden.

Um weiterhin auch die hohe Spezifität des Ag^+ für das Enzym an einem komplexeren in vitro Modell zu belegen, wurden Erythrocyten mit Ag^+ versetzt. Auch in diesem Experiment konnte eine Hemmwirkung des Ag^+ auf das introerythrozytäre Enzym nachgewiesen werden.

WEBB[111] hat festgestellt, daß Ag^+ neben Hg^{2+} einer der wirksamsten Inhibitoren für Enzyme ist, wobei der Hauptangriffspunkt meistens an den Sulfhydrylgruppen lokalisiert ist. HAGASHIDA et al.[130] fanden bei Untersuchungen an mitochondrieller Malat-Dehydrogenase ebenso eine ausgezeichnete Spezifität von Ag^+ bei der Inhibition gegenüber anderen Metallionen. Sie konnten nachweisen, daß die Inhibition durch das Ag^+ per se hervorgerufen wird und daß dieser Vorgang irreversibel ist. Als Angriffsort des Ag^+ konnten sie die Sulfhydrylreste des Enzyms identifizieren. Aus Veränderungen des Helixgehaltes während der Inhibition schlossen sie auf eine durch Ag^+ hervorgerufene Veränderung der Sekundärstruktur des Enzyms, wobei zugleich das aktive Zentrum in Mitleidenschaft gezogen würde. ROSENBLOOM et al.[129] konnte bei Inhibitionsstudien mit Ag^+ am Enzym Phosphoglycerat-Dehydrogenase nachweisen, daß die Wirkung des Ag^+ hauptsächlich darauf beruht, daß das Enzym unter Ag^+-Einwirkung in nicht aktive Untereinheiten zerfällt. ROGERS[117] fand eine durch Ag^+ hervorgerufene Konformationsänderung bei dem Enzym Alkohol-Dehydrogenase.

Aus diesen Untersuchungen kann als ein generelles Prinzip der Ag^+-Inhibitionen bei Enzymen eine Veränderung der Sekundär- und/oder Tertiärstruktur des Proteingerüstes, teilweise begleitet von einer Bindung des Ag^+ an Sulfhydrylgruppen, abgelesen werden. Daraus ergibt sich notwendigerweise für jede Studie einer Ag^+-Inhibition von Enzymen eine Untersuchung der Einflüsse der Ag^+-Wirkung auf Struktureigenschaften des Proteins. Bezüglich der Notwendigkeit einer Bindung von Ag^+-Ionen an das Enzym Glutathionperoxidase, um eine Inhibition hervorzurufen, zwingen die bereits diskutierten Ergebnisse zu dem Schluß, daß für eine Inhibition der Glutathionperoxidase durch Ag^+ eine Bindung des Ag^+ an

das Enzym nicht wie offenbar bei anderen Enzymen notwendig ist.

Die Einwirkung von Ag^+ auf GSH-Peroxidase wurde deswegen mit der Disk-Elektrophorese und der SDS-Elektrophorese untersucht. Auch hier ließ sich neben der Inhibitionswirkung ein Einfluß auf das Proteinskelett als solches zeigen. Ag^+-behandeltes Enzym zeigte nach SDS-Behandlung und SDS-Elektrophorese nicht mehr den sonst immer zu beobachtenden Anteil an tetramerem Enzym sowie drei Banden von kleineren und größeren Proteinteilen neben dem überwiegenden Anteil an Monomeren. Damit ist auch bei der GSH-Peroxidase gezeigt worden, daß Ag^+ ebenso eine Wirkung auf die Sekundärstruktur hat, wie das für andere Enzyme gefunden wurde.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen der Bindung von radioaktivem Ag^+ an das Enzym Glutathionperoxidase soll die Arbeit von HELLERMAN et al.[118] beachtet werden. Diese konnten ebenso keine Bindung von ^{110m}Ag an das Enzym D-Aminosäureoxidase finden. Eine genauere Untersuchung ihrer Versuchsansätze ergab jedoch, daß der Enzymanteil, der mit dem radioaktiven Silber reagiert hatte, ausfiel und somit in den nachfolgenden Untersuchungen des Überstandes nicht erfaßt wurde. Der Überstand enthielt jedoch nur den Enzymanteil, der nicht mit dem radioaktiven Silber reagiert hatte. Sie fanden, daß die Inhibitionsreaktion mit Ag^+ eine alles-oder-nichts-Reaktion ist und benutzten dabei den Begriff der selektiven Inhibition. Bei den Ag^+-Bindungsstudien mit der GSH-Peroxidase war ebenso eine Präzipitation zu beobachten, jedoch zeigten die rund 50 % in Lösung verbleibenden Anteile keine nachweisbare enzymatische Aktivität mehr. Damit liegt für diesen Teil des Enzyms sicherlich ein anderer Vorgang als der bei der D-Aminosäureoxidase beobachtete zugrunde.

5.3. Die Selenkomponente der GSH-Peroxidase und Silber

Da Silber primär an den Sulfhydrylgruppen der Proteine angreift, lag es nahe, daß ebenso die Selenkomponente Ziel der Ag^+-Ionen ist. Wegen der vergleichsweise geringeren Stabilität von organischen Selenverbindungen mußte auch eine sekundär eintretende Eliminierung des Selens in Betracht gezogen werden.

Erste Hinweise, daß die Ag^+-Inhibition mit einer Eliminierung von Selen aus dem Protein einhergeht, ließen sich aus den Reaktivierungsversuchen mit kolloidalem Selen ableiten. Genaueren Überblick ergaben jedoch die Versuche, die unter Verwendung von Gelchromatographien die Inhibitionsansätze genauer untersuchen ließen. Hierbei stellte sich heraus, daß im Mittel ca. 70 % des Selens durch die Einwirkung von Ag^+ eliminiert werden. Bei dem Versuch mit der G150-Säule muß der erhöhte eliminierte Selenanteil unter dem Aspekt gesehen werden, daß die Proteinprobe mit CN^- versetzt worden war. Von Cyanid ist inzwischen bekannt[18], daß es ebenso Selen aus dem Enzym freisetzen kann, wobei die freigesetzte Komponente nicht eindeutig identifiziert werden konnte.

In einer Modellstudie konnte nachgewiesen werden, daß nur Selenocystin von allen untersuchten Selenoaminosäuren mit Ag^+ unter Bildung von Ag_2Se reagiert. Eine gleiche Reaktion unter Eliminierung des Selens vom organischen Rest konnte bei Selenoharnstoff und seinen Derivaten nachgewiesen werden[134, 135]. Außerdem ist bekannt, daß Selenocystin bedeutend leichter zu Selen und Dehydro-Alanin zerfällt als Cystin[155].

Die quantitative Titration der Glutathionperoxidase mit Ag^+-Ionen ergab eine Stöchiometrie von 12 Molen Ag^+ pro Mol Enzym. Wobei dieser Wert in 3,85 M GuAc ermittelt wurde, um ein Ausfallen des Enzyms bei der Reaktion zu vermeiden. Ebenso soll auf die Tatsache hingewiesen werden, daß durch Verdünnung dieser 3,85 M GuAc-Lösung auf 0,1 M Pufferlösung die Aktivität des Enzyms wieder total zurückgewonnen werden konnte, eine Feststellung, die es ermöglichte, die enzymatische Aktivität während der Titration zu verfolgen.

Eine unvollständige Reaktion des Ag^+ mit dem Enzym, die sich aus dem Verlauf der unvollständigen Titration (in Abb. 4.20.), die bereits im ansteigenden Ast der Kurve vorzeitig beendet wurde, ableiten läßt, hatte auch einen geringeren eliminierten Selenanteil zur Folge.

5.4. Modell der Ag^+-Wirkung auf die GSH-Peroxidase

Die Versuchsergebnisse geben uns über den Verlauf der Ag^+-Inhibition der GSH-Peroxidase folgendes Bild:

a) ca. 70 % des Selens werden eliminiert
b) 12 Mole Ag^+ reagieren mit 1 Mol Enzym.

Bisher ist bekannt, daß die GSH-Peroxidase 4 Atome Selen pro Gesamtmolekül enthält[1,2,3] und daß ca. 8 Cystein-Reste im Enzym enthalten sind[17,3], wobei auch ein weniger zuverlässiger Wert von ca. 15 Cystein-Resten gefunden wurde[17]. Nimmt man nun die bereits von CECIL und McPHEE[108] für Cystin-Gruppierungen in Proteinen und von FREDGA[169] für Selenocystin aufgestellten Reaktionsgleichungen für die Reaktion dieser Komponenten mit Ag^+ heran:

1. $2\ RSSR + 3\ Ag^+ + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ RSAg + RSO_2H + 3\ H^+$

2. $2\ RSeSeR + 3\ Ag^+ + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ RSeAg + RSeOOH + 3\ H^+$

so ist klar zu erkennen, daß von 4 Selen- oder Schwefelatomen jeweils eines ein von den anderen verschiedenes Reaktionsprodukt bildet. Zieht man zudem die bereits von CECIL und McPHEE[108] bei Proteinen beobachtete Spaltung der C-S-Bindung an Cysteinresten durch Ag^+-Einwirkung in Betracht und berücksichtigt die dazu relativ unstabilere C-Se-Bindung bei Selenocysteinresten, so kann man daraus ableiten, daß die entstehenden 3 RSeAg Reste mit großer Wahrscheinlichkeit weiter zu R und - unter Ag^+ Aufnahme - Ag_2Se zer-

fallen:

$$3\ RSeAg + 3\ Ag^+ \longrightarrow 3\ R^+ + 3\ Ag_2Se$$

wobei R^+ möglicherweise durch Abspaltung eines Protons stabilisiert werden könnte. Anders verhält sich dagegen die entstandene Seleninsäure (RSeOOH). Diese geht unter den benutzten Versuchsbedingungen keine Bindung mit Ag^+ ein[131]. Zudem gehören die organischen Seleninsäuren zu den stabilsten organischen Selenverbindungen[170].
Da die 4 Selenatome wahrscheinlich auf die 4 Untereinheiten verteilt sind, liegen möglicherweise jeweils R-Se-S-R Verbindungen in jeder Untereinheit vor. Unter Annahme dieses hypothetischen Modells lassen sich nun folgende Reaktionsgleichungen für die Reaktion mit Ag^+ ableiten:

A) Dismutation (Ag^+ katalysiert):

$$4\ RSeSR + 4\ H_2O \longrightarrow 2\ RSH + 2\ RSeH + 2\ RSOH + 2\ RSeOH$$

$$2\ RSOH \longrightarrow RSH + RSO_2H$$

$$2\ RSeOH \longrightarrow RSeH + RSeO_2H$$

$$4\ RSeSR + 4\ H_2O \longrightarrow 3\ RSH + 1\ RSO_2H + 3\ RSeH + 1\ RSeO_2H$$

B) Reaktion mit Ag^+:

$$3\ RSH + 3\ Ag^+ \longrightarrow 3\ RSAg + 3\ H^+$$

$$3\ RSeH + 3\ Ag^+ \longrightarrow 3\ RSeAg + 3\ H^+$$

$$3\ RSeAg + 3\ Ag^+ + 3\ H^+ \xrightarrow{+\ 6e^-} 3\ RH + 3\ Ag_2Se$$

$$4\ RSeSR + 4\ H_2O + 9\ Ag^+ \xrightarrow{+\ 6e^-} 1\ RSO_2H + 1\ RSeO_2H + 3\ RSAg + 3\ H^+ + 3\ RH + 3\ Ag_2Se$$

Berücksichtigt man nun noch die 4 verbliebenen Halbcystin-Reste pro Enzymmolekül nach der Gleichung von CECIL und McPHEE:

$$2\ RSSR + 3\ Ag^+ + 2\ H_2O \longrightarrow 3\ RSAg + RSO_2H + 3\ H^+$$

so ergibt sich für das Glutathionperoxidasemolekül eine Bruttoreaktion:

$$\begin{pmatrix} 4\ RSeSR \\ + \\ 2\ RSSR \end{pmatrix} + 12\ Ag^+ + 6\ H_2O \xrightarrow{+\,6e^-} \begin{pmatrix} 3\ RH \\ 6\ RSAg \\ 2\ RSO_2H \\ 1\ RSeO_2H \end{pmatrix} + 3\ Ag_2Se + 6\ H^+$$

GSH-POD

GSH-POD
(nach Ag^+-Behandlung)

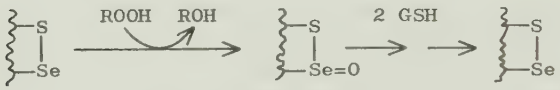
die zeigt, daß 12 Mole Ag^+ pro Enzymmolekül reagieren und dabei 3 Selenatome (also 75 %) eliminiert werden.
Dieses Modell der Reaktion von GSH-Peroxidase mit Silber beruht auf verschiedenen, teilweise unbewiesenen Annahmen. Trotzdem erscheint es legitim, dieses Modell zu diskutieren und zwar aus zwei Gründen:

1. Es kann die Ergebnisse der Experimente erklären, die eine Inhibition durch Ag^+ ohne Bindung des Silbers unter Verbleibs von ca. 30 % Selen im Enzym nachgewiesen haben oder zwingend fordern.

2. Es verdeutlicht, mit welch komplexem Reaktionsgeschehen bei der Wechselwirkung von Ag^+ mit den im Enzym vorhandenen Gruppen gerechnet werden muß.

5.5. Vorstellungen zur Selenkomponente der GSH-Peroxidase

In die Vorstellungen eines Modells der aktiven Selenkomponente sollen alle Hinweise, die bereits in der Einleitung erwähnt wurden, sowie die hier aufgezeigten Untersuchungen einfließen.
Neben dem bereits von GÜNZLER[17] entwickelten Modell (Schema 5):

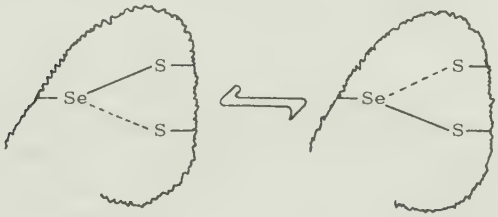


sollen zwei weitere Modelle vorgestellt werden, die die neueren Ergebnisse einschließen.

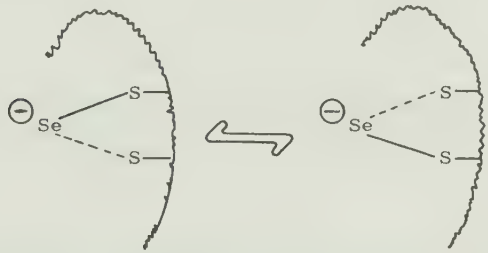
5.5.1. Modell der alternierenden Sulfoselenid-Gruppierung

Zusätzlich zu den bisherigen Feststellungen ergab sich ein neuer Gesichtspunkt aus den Untersuchungen von PROHASKA et al.[18], die bemerkten, daß CN^- Selen aus dem Enzym GSH-Peroxidase zu 92 % freisetzt. Damit ist eine für die GSH-Peroxidase bisher (wegen der mehrfach berichteten CN^--Unempfindlichkeit) nicht diskutierte Selenbindungsweise als neue mögliche Modellvorstellung zu erörtern. Diese sogenannte Sulfoselenid-Gruppierung (-S-SeH) wurde bereits bei dem Enzym Rhodanese nachgewiesen[171] und zeichnete sich durch eine CN^--Instabilität aus.
Diese auch als Selenopersulfid bezeichnete Gruppierung zeigt als Anion, z.B. $GS\text{-}Se^-$, eine starke Affinität zu Jodacetat[172], für eine solche auch für Jodacetamid, das GSH-Peroxidase bekanntlich nicht hemmt, mögliche Reaktion gibt es keine Untersuchungen.
WALTER et al.[173] wies darauf hin, daß Se-S-Bindungen ständig gespalten und neu gebildet werden können, wenn z.B. mehrere S-Bindungsstellen einem R-Se-Rest alternativ zur Verfügung stehen. Die bereits mehrfach beobachtete Frei-

setzung einer flüchtigen Selenkomponente (möglicherweise H_2Se) aus Glutathionperoxidase-Lösungen beim Stehen in gepufferten Lösungen[174,175] läßt sich auch gut mit der Hypothese einer Sulfoselenid-Gruppierung vereinbaren.
GÜNZLERs Vorschlag[17] konnte also auf eine alternierende Sulfoselenid-Gruppierung ausgedehnt werden:



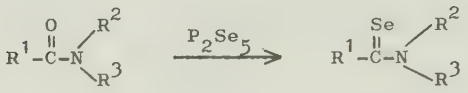
Dieses Modell würde ebenso gut mit den Ergebnissen der Silbertitrationen übereinstimmen, da hierbei das entstehende Seleninsäurederivat am Protein-Skelett verbleibt.
Ein alternativer Vorschlag geht von der Möglichkeit aus, daß das Selenatom nicht kovalent an das Proteinskelett gebunden ist:



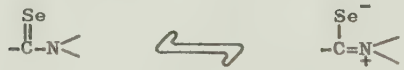
Dieses Modell verfügt über die Eigenschaft einer relativ labilen Bindung des Selens im Protein und ermöglicht zugleich eine einfachere Deutung der Eliminierung des Selens durch die Silberbehandlung.

5.5.2. Das Selenoamid-Modell und die "solvated structure" Stabilisierung

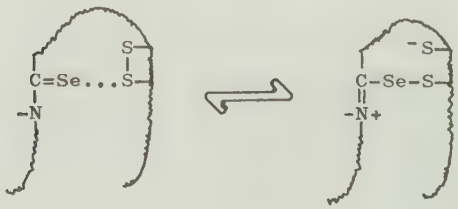
Aus Amid-Gruppierungen lassen sich Selenoamid-Derivate herstellen[176]



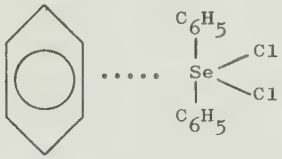
Obwohl dieser Syntheseweg sicherlich nicht in vivo begangen werden kann, soll er als eine Möglichkeit aufgezeigt werden, denn Amid-Gruppierungen liegen in Form von Peptidbindungen in Proteinen in unterschiedlichster Umgebung und unterschiedlicher Zugänglichkeit vor. Rhodanese als Quelle von anorganischem Selen wurde bereits diskutiert[171]. Zudem weist die Selenamid-Struktur Resonanz-Möglichkeit auf[176]:



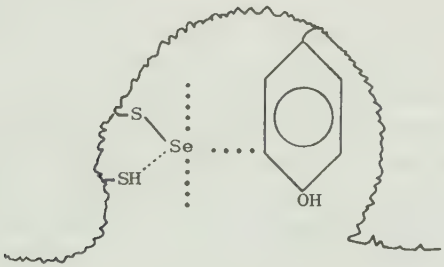
Somit läßt sich in Anlehnung an die bereits vorgestellten Modelle auch folgendes aufstellen:



Aus spektroskopischen Untersuchungen der Glutathionperoxidase läßt sich möglicherweise eine Beteiligung eines aromatischen Restes an dem aktiven Zentrum der GSH-Peroxidase ableiten[177]. Bei Selenanen (SeH_4) läßt sich eine Stabilisierung durch benachbarte Aromaten nachweisen[178]. So wurde für das Diphenyldichlorselenan eine solche als "solvated structure" bezeichnete Stabilisierung gefunden:



In Anlehnung an diesen Befund kann eine solche Stabilisierung auch für die Selenkomponente im GSH-Peroxidase-Molekül diskutiert werden:



Jedes der vorgestellten Modelle ist natürlich rein spekulativ und berücksichtigt einen oder mehrere Teilaspekte mehr oder weniger, deswegen sind auch Übergänge zwischen diesen Modellen denkbar.
Alle Spekulationen über die aktive Selenkomponente der Glutathionperoxidase werden letztenendes jedoch nur durch weitere Untersuchungen des Enzyms widerlegt oder bestätigt werden können.

6. Zusammenfassung

Geringe Mengen an Silber wurden mittels γ-Spektroskopie-Nachweis des radioaktiven Isotops ^{110m}Ag sowie mit Hilfe einer ionensensitiven Elektrode nachgewiesen.
Der Einfluß von Schwermetallen auf Glutathionperoxidase wurde untersucht. Nur Silber zeigte eine totale Hemmung des Enzyms. Ohne Einfluß waren Cd^{+}, Tl^{+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}.
Außerdem zeigen die Halogene J_2 und Br_2 eindeutige Inhibitionen der enzymatischen Aktivität, die Halogenide J^{-} und Br^{-} nicht.
Die Inhibition durch Silber ist unabhängig von der Enzymform (oxidiert, reduziert, mit Jodacetamid behandelt). Bei $1 \cdot 10^{-6}$ M Enzymlösungen wurde mit Silberkonzentrationen über $5 \cdot 10^{-6}$ M Ag^{+} eine totale Hemmung der enzymatischen Aktivität erzielt. Das komplexe $(AgCN)CN^{-}$-Ion sowie trägergebundenes AgCl hemmen ebenso die Glutathionperoxidaseaktivität. Ein Einwirken einer $1 \cdot 10^{-2}$ M Silberlösung auf Erythrocyten bewirkt eine Abnahme der intraerythrozytären Glutathionperoxidase auf 25 %.
Eine teilweise Reaktivierung der silber-gehemmten Glutathionperoxidase war durch colloidales Selen möglich.
Bindungsstudien mit radioaktivem ^{110m}Ag zwingen zu dem Schluß, daß die Inaktivierung der Glutathionperoxidase durch Silber ohne eine Bindung von Silber an das Enzym erfolgt. Rund 70 % des Selens spaltet bei der Inaktivierungsreaktion mit Silber vom Protein ab, während ca. 30 % des Selens am Proteingerüst verbleiben, wobei zugleich jedoch die totale Enzymaktivität verloren geht.
Glutathionperoxidase-Lösungen wurden mit $AgNO_3$-Lösungen titriert und dabei mit der Ag^{+}-ionensensitiven Elektrode der Potentialverlauf gemessen. In 3,85 M Guanidinacetat-Lösungen ergab sich eine Stöchiometrie von 12 Molen Ag^{+} pro Mol Glutathionperoxidase.
Untersuchungen des so behandelten Enzyms in der Disk- und SDS-Elektrophorese zeigten eine Veränderung der Sekundärstruktur des Enzyms.

Die Ergebnisse erlauben weitere Rückschlüsse auf die Struktur der Selenkomponente in Glutathionperoxidase. Die Zahl der möglichen Modelle läßt sich dadurch auf einige wenige einschränken, die mit den hier vorgelegten Ergebnissen in Einklang stehen.

LITERATUR

1 Flohé, L., Günzler, W., Schock, H.H., FEBS Letters, 32, 132 (1973)

2 Oh, S., Ganther, H.E., Hoekstra, W.G., Biochemistry, 13, 1825 (1974)

3 Nakamura, W., Hosoda, S., Kazuko, H., Biochim.Biophys. Acta, 358, 251 (1974)

4 Schwarz, K., Foltz, C.M., J.Amer.Chem.Soc., 79, 3293 (1957)

5 Mills, G.C., J.Biol.Chem., 229, 189 (1957)

6 Menzel, H., Dissertation, Tübingen (1973)

7 Halliwell, B., New Phytol., 73, 1075 (1974)

8 Flohé, L., Zimmermann, R., in: Glutathion, L. Flohé, H.Ch. Benöhr, H. Sies, H.D. Waller and A. Wendel (Eds.) Thieme-Verlag, Stuttgart (1974) p. 245

9 Flohé, L., Günzler, W.A., ibidem, p. 132

10 Flohé, L., Eisele, B., Wendel, A., Z.Physiol.Chem., 352, 151 (1971)

11 Ladenstein, R., Wendel, A., J.Mol.Biol., 104, 877 (1976)

12 Ladenstein, R., Epp, O., Römisch, A., Wendel, A., TEMA (1977), abstract

13 Flohé, L., Schaich, E., Voelter, W., Wendel, A., Z.Physiol.Chem., 352, 170 (1971)

14 Flohé, L., Klin.Wschr., 49, 669 (1971)

15 Günzler, W.A., Vergin, H., Müller, I., Flohé, L., Z.Physiol.Chem., 353, 1001 (1972)

16 Wendel, A., Pilz, W., Ladenstein, R., Sawatzki, G., Weser, U., Biochim.Biophys.Acta, 377, 211 (1975)

17 Günzler, W.A., Dissertation, Tübingen (1974)

18 Prohaska, J.R., Oh, S.H., Hoekstra, W.G., Ganther, H.E., Biochem.Biophys.Res.Com., 74, 64 (1977)

19 Rotruck, J.T., Hoekstra, W.G., Pope, A.L., Nature New Biol., 231, 223 (1971)

20 Sawatzki, G., Diplomarbeit, Tübingen (1974)

21 Japha, A., Dissertation, Halle (1842)

22 Schwarz, K., in: Spurenelemente in der Entwicklung von Mensch und Tier, K. Betke und F. Bindlingmaier (Hrsg.), Urban und Schwarzenberg (1975), S. 1

23 Frost, D.V., Ingvoldstad, D., Chemica Scipta, 8A, 96 (1975)

24 Frost, D.V., CRC Crit.Rev.Toxicol., 1, 467 (1972)

25 Shum, A.C., Murphy, J.C., J.Bacteriol., 110, 447 (1972)

26 Pinsent, J., Biochem. J., 57, 10 (1964)

27 Stadtman, T.C., Science, 183, 915 (1974)

28 Martin, J.L., in: Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology, D.C. Klayman and W.H.H. Günther (Eds.) Wiley-Interscience, New York (1973), p. 683

29 Cummins, L.M., Martin, J.L., Biochemistry, 6, 3162 (1967)

30 Sandholm. M., Acta pharmacol. et toxicol., 36, 321 (1975)

31 Painter, E.P., Chem. Rev., 28, 179 (1941)

32 Ganther, H.E., Biochemistry, 7, 2898 (1968)

33 Hsieh, H.S., Ganther, H.E., Biochim.Biophys.Acta, 497, 205 (1977)

34 Kielland, J., J.Am.Chem.Soc., 69, 1675 (1937)

35 Rhead, W.J., Evans, G.A., Schrauzer, G.N., Bioinorg. Chem., 3, 217 (1974)

36 Flohé, L., Günzler, W.A., Ladenstein, R., in: Glutathion: Metabolism and Function, I.M. Arias, W.B. Jacoby (Eds.) Raven Press, New York (1976), p. 115

37 McConnell, K.P., Portman, O.W., J.Biol.Chem., 195, 277 (1952)

38 Kiker, K.W., Burk, R.F., Am.J.Physiol., 227, 643 (1974)

39 Jenkins, K.J., Hidiroglou, M., Can.J.Physiol.Pharmacol., 50, 927 (1972)

40 Petersøn, P.J., Butler, G.W., Nature, 212, 961 (1966)

41 Ganther, H.E., Hsieh, H.S., in: Trace Element Metabolism in Animals, W.G. Hoekstra, J.W. Suttie, H.E. Ganther, W. Mertz (Eds.), University Park Press, Baltimore (1974) p. 339

42 Hoffman, J.L., Arch.Biochem.Biophys., 179, 136 (1977)

43 Tappel, A.L., Vitamins, Hormons, 20, 493 (1962)

44 Webb, J.L., Enzym and Metabolic Inhibitors, Academic Press (1966), Vol. 3, p. 795

45 Pearson, R.G., Science, 151, 172 (1966)

46 Parizek, J., Ostadalova, I., Experentia, 23, 142 (1967)

47 Parizek, J., Ostadalova, I., Ralovskova, J., Babicky, A., Paulik, L., Bibz, R., J.Reprod.Fert., 25, 57 (1971)

48 Parizek, J., Ostadalova, I., Benes, I., Babicky, A., ibid., 16, 507 (1968)

49 Groth, D.H., Vignati, L., Lowry, L., Mackay, G., Stockinger, H.E., in: Trace Substancen in Environmental Health-IV, D.D.Henphill (Ed.), Univ. Missouri (1973), p. 187

50 Potter, S., Matrone, G., J.Nutr., 104, 638 (1974)

51 Moffitt, A.E., Clary, J.J., Res.Com.Chem.Pathol.Pharmacol. 7, 593 (1974)

52 Chen, R.W., Whanger, P.D., Fang, S.C., Pharmacol.Res. Com., 6, 571 (1974)

53 Burk, R.F., Foster, K.A., Granfield, P.M., Kiker, K.W., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 145, 782 (1974)

54 Hill, C.H., J.Nutr., 104, 593 (1974)

55 Ganther, H.E., Goudie, L., Sunde, M.L., Kopecky, M.J., Wagner, P., Oh, S.H., Hoekstra, W.G., Science, 175, 1122 (1975)

56 Ganther, H.E., Wagner, P.A., Sunde, M.L., Hoekstra, W.G., in: Trace Substances in Environmental Health,D.D. Hemphill (Ed.) Univ. Missouri Press (1972), p. 247

57 Koeman, J.H., Nature, 245, 385 (1973)

58 Pankala, I.S., Pestic.Monitor.J., 6, 107 (1972)

59 Perry, H.M., Erlanger, M.W., Perry, E.P., in: Trace Substances in Environmental Health, Vol. VIII, D.D. Hemphill (Ed.), Univ. Missouri (1974), p. 51

60 Kosta, L., Byrne, A.R., Zelenko, V., Nature, 254, 238 (1975)

61 Bombace, M.A., Cigna Rossi, L., Clemente, G.F., IAEA-SM-175/32, 341 (1974)

62 Chen, R.W., Ganther, H.E., Hoekstra, W.G., Biochem. Biophys.Res.Com., 51, 383 (1973)

63 Fang, S.C., Res.Com.Chem.Pathol.Pharmacol., 9, 579 (1974)

64 Nishigaki, S., Harada, M., Nature, 258, 324 (1975)

65 Wood, J.M., Naturw., 62, 357 (1975)

66 Kar, A.B., Das, R.P., Proc.Natl.Inst.Sci.India, B29, 297 (1963)

67 Mason, K.E., Young, J.O., in: Symposium: Selenium in Biochemistry, O.H. Muth, J.E. Oldfield, P.H. Weswig (Eds.) AVI, Westport (1967) p. 383

68 Gunn, S.A., Gould, T.C., Anderson, W.A.D., Proc.Soc. Exp.Biol.Med., 128, 591 (1968)

69 Chen, R.W., Whanger, P.D., Weswig, P.H., Bioinorg.Chem., 4, 125 (1975)

70 Gasiewicz, T.A., Smith, J.L., Biochim. Biophys.Acta, 428, 113 (1976)

71 Moxon, A.L., Science, 88, 81 (1938)

72 Dubois, K.P., Moxon, A.L., Olson, O.E., J.Nutr., 19, 477 (1940)

73 Hill, C.H., Fed.Proc., 34, 2096 (1975)

74 Ganther, H.E., Baumann, C.A., J.Nutr., 77, 410 (1962)

75 Levander, O.A., Baumann, C.A., Toxicol.Appl.Pharmacol., 9, 106 (1966)

76 Wright, W.R., Ph.D.Thesis, Raleigh (1968)

77 Jensen, L.S., J.Nutr., 105, 769 (1975)

78 Jensen, L.S., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 149, 113 (1975)

79 Godwin, K.O., Partick, E.J., Fuss, C.W., TEMA (1977), abstract

80 Howell, J.McC., TEMA (1977), abstract

81 Noguchi, T., Cantor, A.H., Scott, M.L., J.Nutr., 103, 1502 (1973)

82 Bell, M.C., Bacon, J.A., Bratton, G.R., Wilkinson, J.E., TEMA (1977), abstract

83 Everett, G.A., Holley, R.W., Biochim.Biophys.Acta, 46, 390 (1961)

84 Shaver, S.L., Mason, K.E., Anat.Rec., 109, 382 (1951)

85 Diplock, A.T., Baum, H., Lucy, J.A., Biochem.J., 123, 721 (1971)

86 Wagner, P.A., Hoeckstra, W.G., Ganther, H.E., Proc. Soc.Exp.Biol.Med., 148, 1106 (1975)

87 Jensen, L.S., Fed.Proc., 33, 694, abstract

88 Noguchi, T., Cantor, A.H., Scott, M.L., J.Nutr., 103, 1502 (1973)

89 Schwarz, K., in:Vitamines and Hormones, R.S. Harris (Ed.) Academic, New York (1962), p. 463

90 Riley, M.V., Lehninger, A.L., J.Biol.Chem., 239, 2083 (1964)

91 Morris, V.C., Levander, O.A., Fed.Proc., 31, 691 (1971), abstract

92 Mertz, D.P., Wilk, G., Koschnik, R., Z.Klin.Chem.Klin. Biochem., 13, 13 (1975)

93 Belozerov, E.S., Kalinin, M.G., Prodolobov, N.V., Fiz.-Khim.Probl.Sovrem.Biol.Med., Mater.Konf. (1970), p. 213

94 Saakashvili, T.G., Kvirikadzc, N.A., Tr.Inst.Urol., Akad.Nauk.Gruz.SSR, 1, 93 (1962)

95 Lifshits, V.M., Tr.Voronezhsk.Gos.Med.Inst., 49, 110 (1962)

96 Lifshits, V.M., Lab.Delo, 11, 655 (1965)

97 Wester, P.O., Aktiebolaget Atomenergi, Stockholm, AE 146, (1964)

98 Mozgovaya, E.N., Arnautov, N.V., Izvest.Sibir.Otdel. Akad.Nauk.S.S.S.R., 2, 104 (1960)

99 Dinevich, L.S., Referat.Zhur.Khim., Biol.Khim (1958), abstr. no. 9132

100 Kharchenko, P.D., Stepanenko, P.Z., Fiziol.Zh.(Kiev), 18, 596 (1972)

101 Jandel, J.H., Simmons, R.L., Brit.J.Haematol., 3, 19 (1957)

102 Furchner, J.E., Richmond, C.R., Drake, G.A., Health Phys., 15, 505 (1968)

103 Kalistratova, V.S., Kogan, A.G., Kozlova, M.D., Raspredel.Biol.Deistvic.Radioaktiv.Isotop., Sb.Statei (1966),146

104 Luckey, T.D., Venugopal, B., Hutcheson, D., (Eds.): Heavy Metal Toxicity, Safety and Hormology, G.Thieme Publ., Stuttgart (1975), p.15

105 Moffat, D.B., Creasey, M., Acta Anat., 83, 346 (1972)

106 Van Breeman, V.L., Reger, J.F., Cooper, W.G., J.Biophys.Biochem.Cytol., 2, 283 (1956)

107 Hill, C.H., Starcher, B., Matrone, G., J.Nutr., 83, 107 (1964)

108 Cecil, R., McPhee, J.R., Adv.Prot.Chem, 14, 299 (1959)

109 Gruen, L.C., Biochim.Biophys. Acta, 386, 270 (1975)

110 Chen, R.F., Arch. Biochem.Biophys., 166, 584 (1975)

111 Webb, J.L., Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press (1966), Vol. III, p. 795

112 Methods in Enzymology, Academic Press, New York (1970)

113 Hartman, S.C., ibid., Vol. 17A, p. 941

114 Rosen, O.M., Rosen, S.M., Horecker, B.L., Arch.Biochem. Biophys. 112, 411 (1965)

115 Rogers, K.S., Enzymologia, 36, 153 (1969)

116 Temperli, A., Kuensch, U., Mayer, K., Busch, I., Biochim.Biophys.Acta, 110, 630 (1965)

117 Rogers, K.S., Biochim.Biophys.Acta, 263, 309 (1972)

118 Hellermann, L., Coffey, D.S., Neims, A.H., J.Biol. Chem., 240, 290 (1965)

119 Blin, C., Besson, S., Bull.Soc.Pharm.Nancy, 53, 16 (1962)

120 Yamano, T., Miyzak, M., Nikki, H., Symposia on Enzyme Chem., 11, 42 (1956)

121 Wilson, R., Huffman, L., Brown, H.D., Trans.Mo.Acad. Sci., 3, 53 (1969)

122 Yamamoto, M., Kekkaku, 30, 473 (1955)

123 Britton, J.S., Blank, M., J.Colloid Interface Sci., 43, 564 (1973)

124 Gorin, G., Chin, C., Biochim.Biophys.Acta, 99, 418 (1965)

125 Martinek, K., Savin, Yu.V., Berezin, I.V., Biokhimia, 36, 806 (1971)

126 Martinek, K., Vill, Kh., Streltsova, Z.A., Berezin, I.V., Mol.Biol., 3, 554 (1969)

127 Doyle, M.L., Katzman, P.A., Doisy, E.A., J.Biol.Chem., 217, 921 (1955)

128 Myrbäck, K., Acta Chem.Scand., 12, 839 (1958)

129 Rosenbloom, J., Sugimoto, E., Pizer, L.I., J.Biol. Chem., 243, 2099 (1968)

130 Higashida, H., Semba, R.K., Niwa, F., Kashiwamata, S., J.Biochem., 78, 989 (1975)

131 Fredga, A., Ark.Kem.Mineral.Geol., Bd11B, N:o 46 (1934)

132 Fredga, A., Ber., 71, 286 (1938)

133 Fredga, A., Uppsala Universitets Årsskrift 1935, 5

134 Lipp, M., Dallacker, F., Meier zu Köcker, I., Monatsh. Chem., 90, 41 (1959)

135 Rosenbaum, A., J.Prakt.Chem., 37, 200 (1968)

136 Emeléus, H.J., Dunn, M.J., J.Inorg.Nucl.Chem., 27, 752 (1965)

137 Shapiro, J.R., Ann.N.Y.Acad.Sciences, 192, 215 (1972)

138 Schrauzer, G.N., Bioinorg.Chem., 5, 275 (1976)

139 Luckey, T.D., Venugopal, B., C&EN, Juli 12, 3 (1976)

140 Schrauzer, G.N., White, D.A., Schneider, C.J., Bioinorg.Chem. 7, 35 (1977)

141 Sirover, M.A., Loeb, L.A., Science, 194, 1434 (1976)

142 Schmähl, D., Steinhoff, D., Z.Krebsforsch., 63, 586 (1960)

143 Becker, Th., Markgraf, E., Oswald, H., Schyra, B., Winnefeld, K., Wiss.Chir.-Tag.Deut.Demokrat.Repub., 6te, 2, 1722 (1967)

144 West, H.D., Goldie, H., Kelley, L.F., Clark, Wm.F., Hughes, D., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 92, 116 (1956)

145 Schrauzer, G.N., White, D.A., Schneider, C.J., Bioinorg.Chem., 6, 265 (1976)

146 Review (ohne Autor) in C&EN, Jan. 17, 35 (1977)

147 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., J.Biol.Chem., 193, 265 (1951)

148 Günzler, W.A., Kremers, H., Flohé, L., Z.Klin.Chem. Klin.Biochem., 12, 444 (1974)

149 Watkinson, J.H., Anal.Chem., 38, 92 (1966)

150 Tölg, G., Naturw., 63, 99 (1976)

151 Orlowski, M., Meister, A., J.Biol.Chem., 240, 338 (1965)

152 Maurer, H.R., Disk Elektrophoresis, Walter de Gruyter, New York (1971)

153 Weber, K., Osborn, M.J., J.Biol.Chem., 244, 4406 (1969)

154 Bisswanger, H., Praktikumsvorschrift, Tübingen (1973)

155 Caldwell, K.A., Tappel, A.L., Biochemistry, 3, 1643 (1964)

156 Aigner, R., Spitzy, H., Frei, R.W., Anal.Chem., 48, 2 (1976)

157 Scandurra, R., Piccinini, G., Cavallini, D., Ital.J. Biochem., 13, 424 (1964)

158 Camman, K., Das Arbeiten mit ionensensitiven Elektroden, Springer Verlag, Berlin (1977)

159 Alexander, P.W., Rechnitz, G.A., Anal.Chem., 46, 250 (1974)

160 D'Oratio, P., Rechnitz, G.A., Anal.Chem., 49, 41 (1977)

161 Finazzi Agrð, A., Mavelli, I., Cannella, C., Federici, G., Biochem.Biophys.Res.Com., 68, 553 (1976)

162 Ebel, S., Parzefall, W., Experimentelle Einführung in die Potentiometrie, Verlag Chemie (1975)

163 Gruen, L.C., Harrap, B.S., Anal.Biochem., 42, 377 (1971)

164 Cecil, R., McPhee, J.R., Biochem.J., 59, 234 (1954)

165 Maurette, J.-M., persönliche Mitteilung des Patentes Nr.: 7322 931, Paris (1973)

166 Heil, A., Zillig, W., FEBS Lett., 11, 165 (1970)

167 Orlowski, M., Meister, A., J.Biol.Chem., 240, 338 (1965)

168 Flügge, U.-I., persönliche Mitteilung

169 Fredga, A., Ann.N.Y.Acad.Sci., 192, 1 (1972)

170 Klayman, D.L., in: Organic Selenium Compounds, D.L. Klayman and W.H.H. Günther (Eds.), Wiley and Sons, New York (1973)

171 Cannella, C., Pecci, L., Finazzi Agrð, A., Federici, G., Pensa, B., Cavallini, D., Eur.J.Biochem., 55, 285 (1975)

172 Ganther, H.E., Biochemistry, 10, 4089 (1971)

173 Walter, R., Schwartz, I.L., Roy, J., Ann.N.Y.Acad. Sci., 192, 175 (1972)

174 Wendel, A., Sawatzki, G., unveröffentlicht

175 Ganther, H.E., Prohaska, J.R., Oh, S.-H., Hoekstra, W.G., TEMA (1977), abstract

176 Shine, R.J., in: Organic Selenium Compounds, D.L. Klayman and W.H.H. Günther (Eds.), Wiley and Sons, New York (1973)

177 Graupe, K., persönliche Mitteilung

178 Musher, J.I., Ann.N.Y.Acad.Sci., 192, 52 (1972)

L E B E N S L A U F

Günther Gustav Sawatzki
am 17.10.1948 in Kassel geboren;
von Ostern 1955 bis 14. November 1955 Besuch der Bürgerschule in Kassel;
danach Wohnungswechsel nach Darmstadt und Besuch der Mornewegschule in Darmstadt;
im Anschluß daran Schüler der Georg-Büchner-Schule (Gymnasium) in Darmstadt und am 21.6.1967 Ablegung der Reifeprüfung;
seit dem 17.10.1967 ordentlicher Studierender des Faches Physiologische Chemie und Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen;
am 1.10.1968 legte ich den 1. Teil und am 9.10.1970 den 2. Teil der Vordiplom-Prüfung ab;
am 19.12.1974 Diplomprüfung mit Beendigung meiner Diplomarbeit "Untersuchungen zur Struktur der selenhaltigen Komponente von Glutathionperoxidase (E.C. 1.11.1.9.)";
von Januar 1975 bis Oktober 1977 fertigte ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Dozent Dr. A. Wendel die Dissertation "Die Wirkung von Silber auf das Selenoenzym Glutathionperoxidase (E.C. 1.11.1.9.)" an.

Meine akademischen Lehrer waren:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, U. Weser, L. Flohé
Organische Chemie	E. Bayer, E. Müller
Anorganische Chemie	W. Rüdorff, E. Stumpp
Physikalische Chemie	H. Mauser
Theoretische Chemie	F.F. Seelig
Physiologie	E. Betz, R. Jacob
Anatomie	K. Mörike
Histologie	M. Arnold
Zoologie	F.P. Möhres
Botanik	E. Bünning
Physik	H. Krüger
Mathematik	W. Schweizer
Mikrobiologie	H. Zähner

difo-druck · 8600 bamberg